

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Etude des voies de transduction du signal déclenchées par le lipopolysaccharide (LPS) en modèles de monocytes/macrophages en culture

Candi, Aurélie

Award date:
2006

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



FACULTÉS UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR

Faculté des Sciences

**ETUDE DES VOIES DE TRANSDUCTION DU SIGNAL DECLENCHEES PAR
LE LIPOPOLYSACCHARIDE (LPS) EN MODELES DE
MONOCYTES/MACROPHAGES EN CULTURE**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licenciée en Sciences biologiques**

Aurélie CANDI

Juin 2006

Etude des voies de transduction du signal déclenchées par le lipopolysaccharide (LPS) en modèles de monocytes/macrophages en culture

CANDI Aurélie

Résumé

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique, liée à des facteurs constitutifs et environnementaux. Parmi ces derniers, il est admis de nos jours que les infections par des bactéries Gram-, telles que *Chlamydia pneumoniae*, peuvent participer à l'initiation et au développement des lésions athéromateuses. Dans le cadre de ce travail, nous étudierons les effets d'un composant typique de ces bactéries, le lipopolysaccharide, sur la réponse des monocytes/macrophages, cellules qui participent à la formation des lésions. Le LPS déclenche une signalisation complexe dans laquelle le facteur NF- κ B joue un rôle central, mais il existe des intersections avec d'autres voies, dont la voie PI3K/Akt et la voie mTOR.

Dans la première partie du mémoire, en collaboration avec Unibioscreen, nous évaluerons les propriétés anti-NF- κ B de 3 cardénolides en les testant sur l'activité de liaison de NF- κ B à l'ADN, et ce dans le modèle *in vitro* des monocytes/macrophages humains THP-1.

Dans la deuxième partie de ce mémoire, nous essayerons de préciser l'importance (relative) des voies NF- κ B, PI3K/Akt et mTOR dans la réponse de macrophages murins au LPS. Il s'agit des cellules RAW 264.7, fréquemment utilisées dans ce contexte dans la littérature et bien caractérisées dans notre laboratoire. Nous utiliserons à cet effet 4 inhibiteurs chimiques bien décrits dans la littérature : le BAY 11-7082 pour inhiber la voie NF- κ B, la wortmannine et le LY 294002 pour inhiber la voie PI3K/Akt, et la rapamycine pour inhiber la voie mTOR. Les effets de ces inhibiteurs seront d'abord évalués sur l'activation du facteur NF- κ B induite par le LPS, en suivant son activité de liaison à l'ADN, mais aussi son activité transactivatrice (via un plasmide rapporteur). Nous évaluerons ensuite les effets de ces 4 inhibiteurs sur l'expression génique chez des macrophages stimulés avec du LPS, et ce via le damier DualChip® Mouse Inflammation (Eppendorf). Ce damier permet de suivre l'expression de 233 gènes impliqués dans les processus inflammatoires. Sur base des profils d'expression génique obtenus, nous essayerons d'identifier des groupes de gènes cibles des diverses voies de signalisation déclenchées par le LPS.

Liste des abréviations :

HDL: High Density Lipoprotein
NO : Oxyde Nitrique
PTEN : phosphatase, and tensin homologue deleted on chromosome ten
4E-BP1 : 4E-Binding Protein 1
ADNc : Acide déoxyriboNucléique complémentaire
AMPc : Adenosine Mono-Phosphate cyclic
AP-1: activator protein-1
ARNm : Acide RiboNucléique messenger
BSA : Bovine Serum Albumine
BTK : Burton's Tyrosine Kinase
CBP : CREB binding protein
CCR2: chemokine (C-C motif) receptor 2
CD14 : Cluster of Differentiation 14
C-IAP1 et c-IAP2 : Inhibitor of apoptosis
COX-2 : cyclooxygénase-2
CRP : C-Reactive Protein
CSF-1 : synonyme de M-CSF
DD : Death Domain
DMSO : Diméthyl Sulfoxide
DNA-PK : DNA dependent Protein Kinase
DOPE : dioléoyl phophotidyléthanamine
DOTMA : N-n,n,n-trimethylammonium chloride
EGF : epidermal growth factor
ENG: endogline
FKBP12 : FK506-binding protein
IFN- γ : Interféron- γ
FOSL2: Fos-like Antigen 2
FYVE : Fab1p, YOTB, Vac1, ans Early Endosome Antigen1
GM-CSF /CSF3: granulocyte macrophage-colony stimulating factor
GPI: glycosylphosphatidylinositol
GSK3- β : Glycogen synthase kinase 3 β
G β 1 : G protein beta protein subunit-like
HEAT : Huntignton, EF3, A subunit of PP2A, TOR1
HRP: Horse Radish Peroxidase
ICAM-1 : intercellular adhesion molecule 1
IKK : Inhibitory of kappa-B Kinase
IL: Interleukine
IRAK : interleukin-1 receptor-associated kinase
IRF-3 : IFN regulatory factor 3
IRS-1 : insulin receptor substrate-1
I κ B : Inhibitory of kappa-B
JNK : Jun kinase
JNKK : cJun N-terminal kinase kinase

KO : Knock-out
LBP : Lipopolysaccharide Binding Protein
LDL : Low Density Lipoprotein
LPS : Lipopolysaccharide
Mal : MyD88-like adapter
MAPKs : Mitogen Activated Protein Kinase
MCP-1 : Monocyte Chemoattractant Protein-1
M-CSF : Monocyte-Colony Stimulating Factor
MDM2 : murine double minute 2
MEC : Matrice Extra-Cellulaire
MEKK : Mitogen-activated protein kinase
MIP-1 α : Macrophage Inflammatory Protein
MMP: matrix métallo-protease
mTOR : mammalian Target Of Rapamycin
MTT : bromure de 3,(4,5-diméthyl-thiazol-2-yl)diphényltétrazolium
MyD88 : Myeloid differentiation Factor 88
NEMO : NF- κ B essential modulator
NF- κ B: Nuclear Factor-Kappa B
NIK : NF-B-inducing kinase
 α LDL : Oxidized low-density lipoprotein
PAI-1: Plasminogen activator inhibitor 1
PBS : Phosphate Buffer Saline
PDGF: Platelet-derived Growth Factor
PDK1 : phosphoinositide 3-kinase/3-phosphoinositide-dependent kinase 1
PGI₂ :Prostacycline
PH : Pleckstrin Homology
PI3K : phosphatidylinositol 3 kinase
PIF : PDK1-interacting fragment
PIK : Phosphatidylinositol 3-kinase-related protein kinase
PIKK : PI3K-related kinases
PIP3 : Phosphatidyl Inositol 3 Phosphate
PKA : Protein Kinase A
PKB : Protein Kinase B
PKC : Protéine Kinase C
PKG : Protein Kinase G
PKR : dsRNA-dependent protein kinase
PMA : Phorbol Myristate acétate
PtdIns : Phosphatidyl Inositol
RAFT1 : rapamycin and FKBP target
RAP1 : Rapamycin target protein
Raptor : Regulatory associated protein of TOR
Rictor : Rapamycin-insensitive companion of mTOR
RIF : TIR domain-containing adaptor inducing-IFN-beta
Rpm : tours par minutes

RT :Rétro-transcription
RT°: Room Temperature
SAA1: Serum Amyloid A1
SARM : Sterile alpha and HEAT/Armadillo motif protein
Serpine-1: serine (or cysteine) proteinase inhibitor
SH2 : Scr-homology-2
SHIP1 et SHIP2 : Scr-homology 2 domain-containing inositol 5' phosphatase 1 et 2
siRNA : small interfering RNA
STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription
T25: boîte de culture de 25 cm²
T75 : boîte de culture de 75 cm²
TAK1 : Transforming growth factor β -associated Kinase 1
TBK : TANK-binding protein
TBP : Tata-Binding Protein
TFIIB : Transcription Factor II B
TGF- β : Transforming Growth Factor- β
TICAM-1 et 2 : Toll-IL-1R homology domain-containing adapter molecule 1 et 2
TIMP: tissue inhibitor metallo-proteinases
TIR : Toll/IL-1 receptor
TIRAP : TIR domain-containing adaptor protein
TLR: Toll-like Receptors
TMB : TétraMéthyl Benzidine
TNF- α : Tumor Necrosis Factor- α
Tollip : Toll-interacting protein
TRAF6 et TRAF2 : TNFR associated Factor
TRAM : TRIF-related adapter molecule
TXA₂ :Thromboxane A₂

Remerciements

Arrivée au terme de ce mémoire, je me dois de remercier toutes les personnes y ayant contribué.

Tout d'abord, je remercie Monsieur le Professeur Remacle de m'avoir accueilli au sein de l'U.R.B.C, et de mettre à disposition les moyens nécessaires au bon déroulement de ce projet.

Je tiens aussi à remercier Madame le Professeur Martine Raes pour son écoute attentive, sa disponibilité, ses conseils et remarques éclairés ayant apportés beaucoup à ce projet, ainsi que pour le temps passé aux lectures et corrections. Un tout grand merci !!!

Un remerciement spécial aussi à Sofia, qui m'a fait découvrir les joies du bench, pour ses conseils, son professionnalisme au quotidien, m'ayant apporté beaucoup personnellement, ainsi que pour les lectures et corrections de ce travail et, surtout merci de m'avoir appris le métier de biologiste. Merci

Merci à Martine, pour tes conseils « transfections », partie importante de ce travail, qui n'aurait pas pu se réaliser sans toi. Merci.

Merci Marc, pour l'accès aux programmes informatiques nécessaires, les conseils informatiques et pour ta disponibilité. Merci.

Merci à tous les mémorant(e)s, et compagnons des plus beaux moments que j'ai pu passer pendant ces quatre ans à l'université et en particulier Déborah, Manu, Kayleen, Laurent, Mahia, Neil, Fred et Benoit pour votre bonne humeur au quotidien, l'émulation constante qui planait dans la salle des mémorants, ainsi que pour l'entraide dans les moments durs.

Je voudrais aussi remercier David, pour ton soutien sans failles, pour avoir été toujours avec moi et de mon côté. Merci pour l'aide à l'accès aux articles que j'ai eu en plus, qui ont contribué à enrichir mes informations ainsi que pour avoir refait la mise en page de ce mémoire et les corrections de ce mémoire. Merci !!

Enfin, je remercie tout spécialement mes parents pour m'avoir permis de réaliser mon rêve, apprendre la biologie, pour votre soutien constant, les encouragements m'aidant toujours à garder la tête au dessus de l'eau.

Introduction	- 1 -
1 L'athérosclérose en tant que maladie inflammatoire.....	- 1 -
1.1 Les stades de développement d'une lésion athéromateuse	- 1 -
1.2 Facteurs de risque de l'athérosclérose	- 2 -
1.3 Rôle particulier des monocytes / macrophages.....	- 3 -
2 Intervention des composants bactériens dans la réponse inflammatoire des monocytes/macrophages.....	- 4 -
2.1 Les bactéries gram négatives et le lipopolysaccharide.....	- 4 -
2.1.1 Organisation et composition de la paroi des bactéries Gram-.....	- 4 -
2.1.2 Les récepteurs au LPS	- 5 -
2.1.2.1 Les LPS-Binding Proteins (LBP)	- 5 -
2.1.2.2 Le CD14	- 5 -
2.1.2.3 Les Toll-like Receptors (TLRs)	- 5 -
2.2 Voies de transduction du signal liées au système LPS/TLR4 dans les monocytes-macrophages	- 6 -
2.2.1 Classification en fonction des protéines adaptatrices.....	- 6 -
2.2.1.1 Voie dépendante de MyD88.....	- 6 -
2.2.1.2 Voie indépendante de MyD88.....	- 7 -
2.2.1.3 Autres protéines adaptatrices	- 7 -
2.2.2 Voies de transduction du signal impliquées dans la réponse au LPS.....	- 8 -
2.2.2.1 La voie NF-κB.....	- 8 -
a) Protéines impliquées dans la voie NF-κB	- 8 -
• Protéines Rel.....	- 8 -
• Inhibitory κB proteins (IκB).....	- 9 -
• IκB Kinase (IKK)	- 9 -
• Activation d'IKK.....	- 9 -
• Inactivation d'IKK	- 10 -
b) Voie d'activation classique de NF-κB en réponse au LPS	- 10 -
c) Voies non classiques	- 10 -
d) Inhibition de la voie NF-κB, le BAY 11-7082	- 11 -
2.2.2.2 La voie PI3K-Akt	- 12 -
a) Acteurs impliqués dans les voies d'activation des PI3Ks	- 12 -
• Les phosphatidyl inositols	- 12 -
• Famille des PI3Ks	- 12 -
• Domaines protéiques de reconnaissance des phosphatidyl inositol	- 14 -
b) Voies de transduction du signal activées par les PI3Ks de classe 1	- 14 -
• Substrats de PKB/Akt.....	- 15 -
• Rôle des phosphatases ciblées sur les PtdIns phosphorylés.	- 15 -
c) Inhibiteurs de la PI3K	- 16 -
2.2.2.3 La voie mTOR/FRAP.....	- 16 -
a) Description de la protéine mTOR	- 17 -
b) Voies de signalisation liées à mTOR	- 17 -
• Le complexe Raptor/mTOR (Figure I.30).....	- 18 -
• Le complexe Rictor/mTOR	- 18 -
c) La rapamycine, inhibiteur de la voie mTOR/FRAP.....	- 19 -
3 Les cardénolides	- 19 -
4 Objectifs du mémoire	- 20 -

Matériels et méthodes.....	- 22 -
1 Culture cellulaire	- 22 -
1.1 Matériels.....	- 22 -
1.2 Méthode.....	- 22 -
1.2.1 Culture des monocytes THP-1	- 22 -
1.2.2 Culture des macrophages murins RAW 264.7	- 22 -
2 Evaluation de la cytotoxicité de molécules exogènes	- 23 -
2.1 Matériels.....	- 23 -
2.2 Méthode.....	- 23 -
3 Analyse de l'activation de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription	- 23 -
3.1 Extraction des protéines nucléaires	- 24 -
3.1.1 Matériels.....	- 24 -
3.1.2 Méthode.....	- 24 -
3.2 Dosage de protéines par la méthode de Bradford	- 24 -
3.2.1 Matériels.....	- 24 -
3.2.2 Méthode.....	- 24 -
3.3 Dosage colorimétrique en plaques multi-puits de l'activation de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription par la méthode du Trans-AM®.....	- 25 -
3.3.1 Matériels.....	- 25 -
3.3.2 Méthode.....	- 25 -
4 Évaluation de l'activité transactivatrice d'un facteur de transcription par système rapporteur	- 26 -
4.1 Matériels.....	- 26 -
4.2 Méthode.....	- 26 -
4.2.1 Transfection à l'aide du FuGène6	- 26 -
4.2.2 Transfection à l'aide du Superfect	- 27 -
4.2.3 Transfection à l'aide de la lipofectine	- 27 -
4.2.4 Transfection à l'aide de la lipofectamine 2000	- 27 -
4.2.5 Révélation de l'activité β -galactosidase	- 27 -
4.2.6 Révélation de l'activité luciférase	- 28 -
5 Analyse comparative des profils d'expression génique.....	- 28 -
5.1 Extraction d'ARN total.....	- 28 -
5.1.1 Matériels.....	- 28 -
5.1.2 Méthode.....	- 28 -
5.2 Analyse de l'intégrité de l'ARN au Bioanalyzer.....	- 29 -
5.3 Rétro-transcription en vue d'une hybridation	- 29 -
5.3.1 Matériels.....	- 29 -
5.3.2 Méthode.....	- 30 -
5.4 Hybridation d'ADNc sur un damier à ADN en vue de déterminer des profils d'expression génique	- 30 -
5.4.1 Matériels.....	- 30 -
5.4.2 Méthode.....	- 30 -
Résultats et discussion.....	- 32 -
1 Etude de la réponse inflammatoire, induite par le LPS, de cellules monocytaires humaines en présence ou non de molécules à activité potentiellement anti-inflammatoire : les cardénolides (Collaboration avec la firme Unibioscreen)..	- 32 -

1.1 Modèle cellulaire	32 -
1.2 Détermination de la cytotoxicité des cardénolides sur les THP-1.....	32 -
1.3 Mise au point du modèle de stimulation en présence des cardénolides.....	33 -
1.3.1 Présentation des modèles d'études	33 -
1.3.1.1 Stimulation des macrophages THP-1	34 -
a) Effet du BAY 11-7082 sur l'activation constitutive de NF-κB dans des macrophages THP-1	34 -
b) Effet du BAY 11-7082 sur l'activation induite de NF-κB dans les macrophages THP-1	34 -
1.3.1.2 Stimulation des monocytes THP-1	35 -
1.4 Effets des cardénolides sur l'activité de liaison à l'ADN de NF-κB lors d'une stimulation de monocytes au LPS	36 -
2 Etude des contributions spécifiques des voies inflammatoires NF-κB et PI3K dans la réponse d'un modèle de monocytes / macrophages stimulés au LPS	37 -
2.1 Modèle cellulaire	37 -
2.2 Evaluation de la cytotoxicité des inhibiteurs chimiques sur les macrophages murins.....	37 -
2.3 Effets des inhibiteurs sur l'activité de liaison à l'ADN de NF-κB induit par le LPS	38 -
2.4 Mise au point de la transfection des macrophages murins RAW 264.7	40 -
2.4.1 Choix de l'agent transfectant.....	40 -
2.4.1.1 Mise au point de transfection en présence du FuGène 6.....	40 -
2.4.1.2 Mise au point de transfection en présence du Superfect	41 -
2.4.1.3 Mise au point de transfection en présence de la lipofectine.....	41 -
2.4.1.4 Mise au point de transfection en présence de la Lipofectamine 2000	41 -
2.4.1.5 Essais de double transfection	42 -
2.5 Effets des inhibiteurs sur l'activité transactivatrice de NF-κB.....	43 -
2.6 Effets des inhibiteurs des voies PI3K/Akt et mTOR sur les profils d'expression génique de macrophages murins RAW 264.7	44 -
2.6.1 Gènes sous- et surexprimés en présence de LPS.....	45 -
2.6.2 Intervention de la voie NF-κB dans la régulation de l'expression génique	47 -
2.6.3 Intervention de la voie des PI3K/Akt et mTOR dans la régulation de l'expression génique	48 -
2.6.3.1 Gènes dont l'expression varie en présence de LY294002	48 -
2.6.3.2 Gènes dont l'expression varie en présence de wortmannine.....	49 -
2.6.3.3 Gènes dont l'expression est régulée par la rapamycine.	50 -
Conclusions et perspectives	51 -
Bibliographie.	55 -

1. Introduction

Introduction

1 L'athérosclérose en tant que maladie inflammatoire

L'athérosclérose est une maladie chronique inflammatoire des artères de gros et moyen calibres (artères coronaires, artères carotides, artères fémorales et abdominales), due à une dérégulation du métabolisme lipidique et à l'accumulation d'éléments fibreux sous la paroi artérielle, entraînant une modification de la morphologie de celle-ci (Lusis 2000). Cette maladie, très répandue dans les pays développés et en Europe de l'Est, entraîne la dégénérescence des artères et est donc une des causes majeures de mortalité (infarctus du myocarde, accident vasculaire cérébral, gangrène, ...) (Pepine 2001).

De nombreuses études ont montré une composante inflammatoire de cette maladie. En effet, des acteurs du système immunitaire, comme les monocytes et les lymphocytes, sont présents dans les lésions athéromateuses dès le début de la genèse de celle-ci (Hansson 2005). Les médiateurs libérés par ces cellules renforcent le processus d'inflammation local au site de la lésion et mènent ainsi à son développement. L'importance des facteurs de risques sont à prendre en compte dans le développement de la maladie. Ils sont repris dans le tableau I.1.

1.1 Les stades de développement d'une lésion athéromateuse

Différentes écoles se disputent encore toujours les causes premières initiant la formation des plaques d'athérosclérose, mais, il est dorénavant communément admis que la théorie de réponse à l'agression englobe les principales théories explicatives et implique tous les acteurs cellulaires principaux (cellules endothéliales, cellules musculaires lisses, monocytes/macrophages, lymphocytes T, ...) intervenant dans la formation de la plaque (Stocker and Keaney 2004) (**Figure I.1**).

Les athéromes sont des lésions caractérisées par un épaississement asymétrique, ainsi que par une perte d'élasticité de l'intima (première tunique constituant les vaisseaux sanguins) (Ross 1999; Stocker and Keaney 2004) (**figure I. 2a et 2b**).

La formation d'une plaque d'athérome est un processus lent et progressif, qui commence dès le plus jeune âge. Les lésions précoces d'athérosclérose, communément appelées stries lipidiques sont réduites et apparaissent jaunâtres en coupe histologique. On y retrouve des cellules spumeuses, macrophages gorgés de lipides, et des lymphocytes T (Berliner et al. 1995). Elles se forment à partir d'une lésion limitée de l'endothélium, pouvant être d'origines diverses, dont des forces de cisaillement en zone de flux sanguin turbulent, ou des infections systémiques. Cette blessure permet aux LDL (pour Low Density Lipoprotein, forme de transport du cholestérol dans le sang) de pénétrer dans l'intima et de s'y faire oxyder progressivement (Kutuk and Basaga 2003). Ces lésions précoces sont réversibles, mais c'est à partir de celles-ci que vont se former les athéromes. La présence de ces lésions limitées n'entraîne donc pas les symptômes de l'athérosclérose avancée (**figure I.3**).

Ensuite, l'évolution des lésions est fonction du mode de vie de l'individu (de son hygiène alimentaire, par exemple), mais aussi de toute une série de facteurs de risques divers, dont des facteurs héréditaires (tels que l'hypercholestérolémie familiale) et l'âge... (**Tableau I.1**). Les facteurs de risques s'accumulant, le danger que les lésions s'étendent augmente. Progressivement avec l'accumulation et l'oxydation des LDL dans l'intima, les macrophages les absorbent activement et la population de cellules spumeuses (ou lipophages) augmente, ce qui mène à l'apparition de la lésion fibro-graisseuse. Successivement à l'activation des macrophages par les LDL modifiées, ceux-ci libèrent dans l'intima une large gamme de

cytokines, stimulant entre autres, la prolifération et la migration cellulaire des leucocytes et cellules musculaires lisses (CML) vers l'intima, et l'internalisation de LDL modifiées par les CML, ce qui contribue à l'entretien du processus inflammatoire installé dans cette lésion. Les cellules spumeuses, les lymphocytes T, et la composante issue des cellules musculaires lisses entrent dans un cercle vicieux entraînant une migration cellulaire accrue dans l'intima, une prolifération cellulaire croissante, ainsi qu'une fibrose progressive. L'endothélium se soulève de plus en plus. L'inflammation au niveau de la lésion d'athérosclérose devient chronique. Cependant, dans les dernières phases de croissance, les athéromes à chape fibreuse, ou encore plaques fibreuses, s'étendent plus vers la lumière du vaisseau sanguin. La zone centrale de l'intima composée de débris cellulaires, de cellules spumeuses, de cristaux de cholestérol, et de cellules musculaires lisses est appelée le cœur nécrotique de la lésion athéromateuse. Graduellement, le cœur nécrotique s'étend à la média (tunique intermédiaire composant les vaisseaux sanguins), provoquant alors la fragilisation de la paroi vasculaire.

Trois mécanismes principaux peuvent mener à l'ischémie, dont une ulcération de l'endothélium par endroits, mettant à nu la lame basale, ce qui conduit à la formation d'un caillot. De plus, la plaque peut se rompre et un caillot peut se former lorsque le sang infiltré dans la plaque rompue, va rencontrer des protéines facilitant la coagulation (comme le facteur tissulaire) (Hansson 2005). Enfin, il se peut qu'un micro-vaisseau irriguant l'athérome se rompe, provoquant dès lors une coagulation avec formation d'un caillot (Libby 2002).

Pour toutes les fois où un caillot réversible se forme, le système de fibrinolyse se mettra en route, la plaque sera cicatrisée (par l'intervention d'un processus inflammatoire). En revanche, le déclenchement de cette cicatrisation va encore agrandir la plaque.

1.2 Facteurs de risque de l'athérosclérose

Différents facteurs de risques peuvent provoquer les lésions endothéliales primordiales ou aggraver celles-ci. Parmi ces facteurs, on retrouve l'âge, le sexe, l'hypercholestérolémie et les antécédents familiaux.

Par contre, on sait de nos jours que certaines habitudes alimentaires, telles qu'une consommation faible d'antioxydants ou une alimentation déséquilibrée avec excès de graisses animales, des comportements sociaux (activité sédentaire), l'hypertension artérielle (Li and Chen 2005) et l'obésité, ainsi que la consommation régulière de tabac, peuvent aussi augmenter le risque de maladies cardiovasculaires (**Tableau I.1**).

Par ailleurs, s'il existe une relation généralement admise entre athérosclérose et inflammation chronique (Lind 2003), il pourrait aussi y avoir un lien avec les maladies infectieuses, bien que cette relation reste mal comprise et toujours débattue (pour une revue, voir (Gurfinkel and Lernoud 2006)). Les pathogènes le plus souvent impliqués sont *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, ainsi que certains virus (*Herpes simplex*, hépatite A, *Influenza*, *cytomegalovirus*, ...). En effet, il est admis que les lésions d'athérosclérose peuvent se former sans intervention d'agents pathogènes, mais des antigènes de bactéries Gram négatives, telles que *C. pneumoniae* et *H. pylori* ont été retrouvés dans des extraits issus de lésions athéromateuses avancées (tel qu'il a été rapporté dans l'article de Romano Carratelli et son équipe, ainsi que dans la revue de (Shor and Phillips 1999) et dans des plaques d'athéromes *in vivo* (Gurfinkel and Lernoud 2006; Kaklikkaya et al. 2006). Il semblerait que ces agents stimulent la réaction inflammatoire des macrophages, des CML et cellules endothéliales (**Figure I.4**). Plusieurs auteurs ont constaté une corrélation entre des marqueurs d'inflammation systémique, tels que la CRP (C-Reactive Protein) et le fibrinogène, et la présence d'Ig contre *C. pneumoniae*, dans le sérum de patients atteints de maladies coronariennes.

L'infection peut aussi agir de façon indirecte, les médiateurs d'inflammation libérés à un endroit peuvent exercer leur action à des sites éloignés du site source de l'infection. Ces médiateurs pourraient donc stimuler la croissance ou la déstabilisation des plaques déjà formées.

Etant donné cette relation entre infection et athérosclérose, des essais cliniques utilisant des antibiotiques ont été lancés ces dernières années chez des patients atteints de maladies cardio-vasculaires chroniques ou aiguës (pour une revue, voir (Anderson and Muhlestein 2004)). Ces essais, bien que préliminaires, restent décevants et ne montrent pas d'effets significatifs des antibiotiques en prévention des maladies cardio-vasculaires.

En conclusion, l'inflammation est bien un mécanisme impliqué dans le développement et l'instabilité des lésions liées à l'athérosclérose et l'infection par des pathogènes semble augmenter cette instabilité, même si les premiers essais d'intervention avec des antibiotiques se sont avérés décevants. Des travaux récents confirment que l'inflammation et l'infection provoquées par *C. pneumoniae* sont bien en corrélation avec la sévérité des maladies artérielles périphériques (Kaperonis et al. 2006) et des maladies coronariennes (Romano Carratelli et al. 2006). *C. pneumoniae* est une bactérie Gram négative, c'est pourquoi, dans ce mémoire, nous nous focaliserons sur la composante inflammatoire de la pathologie et nous utiliserons comme modèle d'étude la stimulation de monocytes/macrophages par le LPS (lipopolysaccharide). Ce composant de la paroi des bactéries Gram- sera décrit en détail ainsi que les voies principales de transduction du signal qu'il peut activer dans les monocytes/macrophages.

1.3 Rôle particulier des monocytes / macrophages

Outre les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les lymphocytes qui jouent un rôle bien établi dans le développement des lésions athéromateuses, les monocytes/macrophages sont également des acteurs cellulaires centraux dans le développement de l'athérosclérose et de sa composante inflammatoire.

Les monocytes sont recrutés très tôt dans le développement de l'athérome. En effet, ils sont tout d'abord recrutés à la surface endothéliale grâce à l'interaction de leurs récepteurs de surface à des molécules d'adhérence exprimées à la surface de l'endothélium, suite à un stimulus de type athérogène (lipoprotéines) ou inflammatoire (cytokines) par exemple (**Figure I.5**).

La migration transendothéliale des monocytes va ensuite permettre à ces cellules de pénétrer dans la subendothéliale où, ils s'y différencient en macrophages, sous l'influence du M-CSF (**Figure I.6**). Ce facteur de croissance leucocytaire est produit par une large gamme de cellules, telles que les cellules endothéliales et mésenchymateuses (Oren et al. 2001). Cette différenciation en macrophages rend les cellules capables de répondre et de participer activement à une réponse inflammatoire et à la mise en place de l'immunité innée, c'est-à-dire entre autres de sécréter des cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-1 β , TNF- α , ...), des composants de la voie d'activation du complément et des protéases dont les métallo-protéases (MMP) dégradant la MEC, mais aussi de produire des dérivés actifs de l'oxygène (Tedgui 2001; Linton and Fazio 2003). En plus d'un recrutement de cellules monocytaires accru, et en raison de l'augmentation de la perméabilité aux sites de blessures endothéliales, les lipoprotéines riches en cholestérol en excès, peuvent s'infiltrer dans la paroi artérielle, où elles vont subir des modifications dues à la faible teneur en anti-oxydants de l'intima. Les macrophages vont alors internaliser les lipoprotéines oxydées par le biais de récepteurs peu spécifiques, les récepteurs « scavengers ». Cette interaction « ligand - récepteur » provoque

l'internalisation des lipoprotéines à l'intérieur de la cellule, menant ainsi à la formation de cellules spumeuses ou lipophages (Osterud and Bjorklid 2003).

Ces lipoprotéines oxydées sont ressenties comme un signal d'agression. Les acteurs de l'inflammation, comme les monocytes et les lymphocytes T, sont alors recrutés en plus grand nombre au site de la lésion. Ces cellules sécrètent dès lors toute une série de messagers pro-inflammatoires, tels que le TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-12, l'IL-8 et le M-CSF, mais augmentent aussi l'expression de certains gènes, comme ceux encodant les récepteurs aux LDL modifiées. Ces médiateurs vont mener à l'activation endothéliale, au recrutement et à la diapédèse de nouveaux leucocytes, et mener ainsi à l'amplification de la réponse inflammatoire (**figure I. 6**).

2 Intervention des composants bactériens dans la réponse inflammatoire des monocytes/macrophages

2.1 Les bactéries gram négatives et le lipopolysaccharide

En raison de la différence de composition de leur paroi, les bactéries sont principalement divisées en deux classes distinctes : les bactéries « Gram négatives » et les bactéries « Gram positives ». Cette classification est basée sur le résultat de la coloration de Gram, permettant de discriminer visuellement ces deux classes de bactéries en raison de la composition chimique et de l'ultrastructure de leur paroi (**Figure I.7**). Puisque dans ce mémoire nous nous intéressons plus particulièrement aux effets du LPS, composant majeur de la paroi des bactéries Gram-, sur des macrophages en culture, nous allons décrire en détail cette molécule, les récepteurs qui la reconnaissent chez les mammifères, et la signalisation qu'elle déclenche en aval de ces récepteurs.

2.1.1 Organisation et composition de la paroi des bactéries Gram-

Le peptidoglycan est un composant des parois bactériennes que l'on retrouve chez les bactéries Gram- et Gram+. Il forme une couche plus ou moins épaisse, appelée aussi couche de muréine, constituée de sucres aminés et d'acides aminés (**figure I.8**). Leur assemblage permet de réaliser un maillage serré englobant la bactérie. Chez les bactéries Gram-, cette enveloppe de muréine est mince, alors qu'elle est bien plus épaisse chez les bactéries Gram+ (Costerton et al. 1974) (Ulmer 2002) (**Figure I. 8**). Chez les bactéries Gram-, la membrane externe se superpose à la couche de muréine. Elle est composée d'une bicouche de phospholipides et de protéines. C'est dans le feuillet externe de cette bicouche lipidique que les phospholipides sont remplacés par le composé majeur amphiphile de la paroi bactérienne, le LPS ou endotoxine (Ulmer 2002). La composition de cette molécule complexe de 10 kDa est très variable parmi les groupes bactériens. Elle possède les caractéristiques essentielles permettant son insertion dans une bicouche lipidique, à savoir une extrémité hydrophobe d'un côté et une extrémité hydrophile de l'autre. Cette molécule est formée de 3 parties : le lipide A, le « core », et la chaîne O (**figure I.9**) :

- Le lipide A : partie hydrophobe du LPS servant d'ancrage à la membrane, le lipide A est constitué d'un dimère phosphorylé de glucosamine sur lequel sont greffées, à des positions variables, plusieurs molécules d'acides gras saturés à 14 carbones. Le lipide A contribue au caractère immunogène du LPS.

- Le « core » : il s'agit d'une courte séquence de sucres liés à un des sucres aminés du lipide A. Cette séquence est relativement conservée parmi les bactéries Gram- ; en effet, on retrouve fréquemment 2 sucres inhabituels : l'acide 2-céto-3 déoxyoctonoïque et un heptose.

- **La chaîne O** : cette chaîne de sucres plus longue que le core est composée d'unités tri, tétra- ou pentasaccharidiques répétées de nombreuses fois. La séquence de cette chaîne est ici spécifique de l'espèce bactérienne.

La membrane externe comporte également des protéines permettant le passage de molécules hydrophiles, telles les porines (Costerton et al. 1974).

2.1.2 Les récepteurs au LPS

La liaison du LPS aux cellules eucaryotes est un mécanisme complexe qui se déroule en plusieurs étapes :

1° Liaison du LPS aux LBP (LPS-Binding Protein)

2° Liaison du complexe « LPS – LBP » par les protéines CD14

3° Transfert du LPS au TLR4 (**Figure I.10**).

2.1.2.1 Les LPS-Binding Proteins (LBP)

Le LPS se lie d'abord aux « LPS-binding protein » (LBP) (Ulmer 2002; Palsson-McDermott and O'Neill 2004). Le rôle majeur des LBP, glycoprotéines de 60 kDa, est de constituer un pont entre le LPS et son récepteur (Amura et al. 1998). Ces protéines plasmatiques, produites par le foie (jusqu'à 20 µg/ml lors de la phase aiguë d'une infection), peuvent se trouver d'une part sous une forme soluble, circulant dans le flux sanguin, et d'autre part, sous une forme liée aux membranes plasmiques. Les complexes « LBP – LPS » sont reconnus par le récepteur CD14 présent en surface des cellules monocytaires/macrophages (Guha and Mackman 2001) (**Figure I.10**).

2.1.2.2 Le CD14

Le CD14 est une glycoprotéine de 55 kDa impliquée dans la liaison du LPS au TLR4, et exprimée par toute une série de types cellulaires dont les cellules monocytaires, les lymphocytes B, et certaines cellules épithéliales. On la trouve sous forme liée à la membrane, appelée « mCD14 », ou soluble, appelée « sCD14 » (Amura et al. 1998). La forme soluble de la protéine permet au LPS d'interagir avec les TLR4 en membrane des cellules épithéliales et endothéliales, celles-ci ne possédant pas d'isoformes membranaires, alors que l'activation du monocyte par le LPS nécessite la liaison du complexe « LPS – LBP » à la protéine membranaire « mCD14 ». Chez les cellules monocytaires, la protéine mature est fixée par une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) à la membrane plasmique des cellules (**Figure I.10**).

Bien que l'ancre GPI soit un système d'ancrage à la membrane, la protéine n'est insérée que dans le feuillet externe de la membrane plasmique, ce qui empêche l'interaction entre mCD14 et des protéines cytoplasmiques. Un lien entre le complexe « LPS-CD14 » et les récepteurs associés doit donc exister : il s'agit des Toll-like Receptors (TLRs) (**Figure I.10**).

Ulmer et son équipe soulignent l'emplacement régulier des protéines à ancre GPI dans des microdomaines de la membrane plasmique, appelés « lipid rafts ». Ces domaines ont des rôles divers et encore mal connus, mais on admet qu'il s'agit de plateformes de signalisation enrichies en protéines impliquées dans diverses voies de transduction du signal (GTP-Binding proteins, pompe à Na⁺/K⁺-ATPase, ...) (Ulmer 2002).

2.1.2.3 Les Toll-like Receptors (TLRs)

Il existe dix homologues de ces récepteurs chez l'homme, et l'implication de 7 d'entre eux, les TLR 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 9, dans les processus de réponse contre les agents bactériens et

viraux, est bien décrite. Les caractéristiques principales de ces récepteurs sont reprises dans la figure I.11.

Le TLR4, récepteur spécifique au LPS, est le premier récepteur Toll identifié chez l'homme ; dès lors, il a longtemps porté le nom de hToll pour « human Toll ». Cependant, certaines équipes ont montré que toutes les réponses au LPS ne passent pas par le TLR4, ce qui est le cas du LPS de certaines espèces telles que *P. gingivalis*, qui interagirait avec d'autres TLRs, comme le TLR2. La structure du LPS, différente en fonction de l'espèce bactérienne, peut être reconnue par différents TLRs, induisant des réponses différentes. Cela permet à l'organisme infecté de donner rapidement au système immunitaire une indication précise du pathogène présent. Le TLR4 est associé à une autre protéine, essentielle à son bon fonctionnement, MD-2. Cette protéine joue le rôle d'adaptateur extracellulaire dans l'activation du TLR4 par le LPS (Guha and Mackman 2001). Elle est composée de deux sous-unités, liées par des ponts disulfures et est sécrétée par les monocytes et les cellules dendritiques (Palsson-McDermott and O'Neill 2004). L'épitope du LPS reconnu par cette protéine est le lipide A.

L'interaction du LPS au TLR4, comme illustré à la figure I.12 se déroule comme suit :

- 1° Liaison du LPS à MD-2
- 2° Liaison du LPS au TLR4 via ses régions répétées riches en leucine
- 3° Agrégation des TLR4
- 4° Transmission du signal (Palsson-McDermott and O'Neill 2004).

2.2 Voies de transduction du signal liées au système LPS/TLR4 dans les monocytes-macrophages

2.2.1 Classification en fonction des protéines adaptatrices

On sait de nos jours que des interactions moléculaires complexes se déroulent entre différents adaptateurs cytoplasmiques et le récepteur activé.

L'importance de ces différentes combinaisons n'est pas à sous-estimer, car le recrutement différentiel par ces adaptateurs des protéines cibles, initiant les différentes voies de transduction du signal à travers la cellule, permet à celle-ci d'induire une réponse diversifiée et amplifiée, à tous les acteurs impliqués dans la réponse inflammatoire (**Figure I.13**).

2.2.1.1 Voie dépendante de MyD88

L'adaptateur le mieux connu communiquant entre le TLR4 et les acteurs menant à l'activation du facteur de transcription NF- κ B, est la protéine MyD88 pour « Myeloid differentiation Factor 88 ». MyD88 possède deux domaines principaux : un domaine TIR en position C-terminale, séparé par un court peptide d'un « Death Domain » (DD) en position N-terminale. Ce DD a été premièrement identifié sur les domaines cytoplasmiques des récepteurs au TNF et Fas, signaux menant à l'induction de la mort cellulaire programmée ou apoptose. Ce domaine a pour rôle d'interagir avec d'autres DD, retrouvés entre autres dans certaines protéines de la voie des MAPK et de NF- κ B.

« Mal » (pour MyD88-like, encore appelé TIRAP) est une protéine interagissant avec MyD88. Des combinaisons particulières de protéines Mal avec certains TLRs ont été démontrées. Elles pourraient jouer un rôle dans le mécanisme à la base de la reconnaissance spécifique des ligands reconnus par les divers types de TLRs (**Figure I.13**).

Cependant, il doit exister d'autres protéines adaptatrices, car des souris Knock-Out (KO) pour le gène codant pour la protéine MyD88, montrent une réponse des monocytes au LPS,

suggérant ainsi la participation de voies alternatives dans la réponse au LPS (pour une revue, voir (Palsson-McDermott and O'Neill 2004)).

Certains auteurs désignent aussi des interactions possibles entre MyD88 et la PI3K en réponse au LPS, démontrant dès lors une communication possible entre l'activation des cellules au LPS, via les TLR4 et l'activation des PI3Ks (Fukao and Koyasu 2003).

Enfin, un recrutement spécifique des différentes protéines adaptatrices dans le temps a été observé. Pour les **réponses rapides** à la liaison du LPS au TLR4, l'activation des voies de transduction du signal est dépendante du recrutement de MyD88 et de Mal.

Par contre, pour les **réponses tardives** au LPS, les protéines TRIF (ou TICAM-1), pour TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β , et TRAM (TRIF-related adapter molecule ou TICAM-2) sont engagées dans l'activation à long terme de NF- κ B et d'IRF-3 (IFN-regulated factor-3) (Palsson-McDermott and O'Neill 2004).

2.2.1.2 Voie indépendante de MyD88

Comme il a été signalé ci-dessus, lors des réponses tardives au LPS, les protéines TRIF et TRAM s'associent au TLR4 afin de transmettre les signaux à travers la cellule, notamment via les voies de transduction du signal activant NF- κ B et IRF-3. L'expression d'IFN- β (Interféron- β) (Palsson-McDermott and O'Neill 2004), la libération d'IL-18 médiée par la caspase 1, et la production de molécules co-stimulatrices, sont aussi induites via cette voie indépendante de MyD88 (Bjorkbacka et al. 2004). La protéine adaptatrice TRIF est aussi impliquée dans d'autres voies de perception des agents pathogènes ; en effet, dans le cas de la reconnaissance d'éléments pathogènes par le TLR3, TRIF est la seule protéine adaptatrice connue pour ce récepteur. S'il a bien été confirmé que TRIF intervient dans les voies de transduction indépendantes de MyD88, une interaction directe entre le TLR4 et TRIF n'a pu être montrée. Dans ce contexte, la protéine TRAM a été découverte, lien nécessaire entre le TLR4 et TRIF. D'autres interactions avec d'autres récepteurs Toll n'ont pu être démontrées. TRAM apparaît donc comme un composant spécifique de la perception au LPS via le TLR4. L'activation retardée de NF- κ B via la voie indépendante de MyD88 s'opère par la liaison de TRIF à TRAF6. Cette liaison s'effectue via des domaines répétés de TRAF6 situés en position N-terminale.

Des études ont démontré par l'utilisation de damiers à ADN, que parmi les milliers de gènes induits par le LPS, seulement 21,5 % de ceux-ci dépendaient de l'expression de MyD88 (Bjorkbacka et al. 2004).

2.2.1.3 Autres protéines adaptatrices

D'autres protéines adaptatrices intervenant dans la réponse au LPS ont été identifiées plus récemment, mais leurs fonctions précises ne sont pas encore bien connues. C'est le cas des protéines SARM, Tollip, PKR et BTK (Palsson-McDermott and O'Neill 2004).

2.2.2 Voies de transduction du signal impliquées dans la réponse au LPS

La perception du LPS dans le milieu extérieur par les monocytes et macrophages active un grand nombre de voies de transduction du signal, dont les voies de transduction du signal menant à l'activation des MAPKs ERK, JNK et p38, mais aussi des PI3Ks. Cependant, la principale voie connue et décrite de façon précise à ce jour, est la voie menant à l'activation du facteur de transcription NF- κ B (Figure I.12).

La stimulation des cellules au LPS entraîne aussi une activation des Protéines Kinases C (PKC), essentiellement des PKC « atypiques », cibles activées par la voie de la Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K), également activée par le LPS (Guha and Mackman 2001).

Les principaux facteurs de transcription activés lors de la réponse au LPS sont NF- κ B/Rel, AP-1 et CREB. Enfin, la liaison à l'ADN et l'activité transactivatrice de ces facteurs de transcription mènent à la production d'un grand nombre de cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF- α , mais aussi celle de certaines enzymes produisant des messagers pro-inflammatoires et vaso-actifs, comme la iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase), produisant du NO, et la COX-2 (Cyclo-oxygénase 2), produisant les prostaglandines (Guha and Mackman 2001) (Figure I. 14).

2.2.2.1 La voie NF- κ B

« NF- κ B », (Nuclear Factor – κ B) désigne un ensemble de facteurs de transcription dimériques, composés de protéines de la famille Rel, reconnaissant des séquences particulières d'ADN, activés par différents stimuli, dont le TNF- α , l'IL-1 et le LPS (Brand et al. 1997). Bien que les premières découvertes sur ce facteur de transcription ont été effectuées sur les gènes codant pour des immunoglobulines chez des lymphocytes B, nous pouvons aujourd'hui affirmer que ces protéines sont ubiquitaires et présentes dans la plupart des cellules de l'organisme (Karin and Ben-Neriah 2000). Cette voie est impliquée dans l'induction de l'expression d'un grand nombre de gènes collaborant dans la réponse aux infections virales et microbiennes, à l'inflammation et à d'autres situations de stress, via l'expression de molécules d'adhérence, de cytokines, d'interférons, ... (Magnani et al. 2000). Tous ces mécanismes demandent une réponse rapide de la cellule face à ces agressions (Figure I.14).

a) Protéines impliquées dans la voie NF- κ B

• Protéines Rel

Cinq membres de cette famille, divisés en deux groupes, ont été identifiés. D'une part, il s'agit des protéines NF- κ B1 (p50 et son précurseur p105) et NF- κ B2 (p52 et son précurseur p105), l'étape finale de synthèse de p50 et p52 nécessitant un clivage dépendant du protéasome (Karin and Ben-Neriah 2000). D'autre part, il y a les protéines c-Rel, RelA (p65), et RelB, protéines traduites directement sous forme mature et fonctionnelle (Tian and Brasier 2003).

Ces protéines possèdent deux domaines principaux : un domaine RHR de plus ou moins 300 acides aminés, pour « Rel Homology Region », avec deux domaines Ig-like (Immunoglobulin-like), connectés entre eux par un court segment flexible et la séquence NLS (Nuclear Localization Sequence) (Figure I.15).

Parmi les divers dimères connus à ce jour, le dimère p65/c-Rel présente la capacité de liaison à l'ADN la plus forte. En outre, les homodimères composés des protéines p50 et p52

sont considérés comme des répresseurs transcriptionnels (Magnani et al. 2000) (Gadjeva et al. 2004). Si plusieurs hétéro- et homodimères constitués de différentes protéines Rel ont été identifiés, leurs mécanismes de régulation de base s'effectuent de manière comparable.

• Inhibitory κ B proteins (I κ B)

La famille des protéines inhibitrices comporte plusieurs protéines; on retrouve les protéines I κ B $_{\alpha}$, I κ B $_{\beta}$ et I κ B $_{\gamma}$, qui sont les plus fréquemment rencontrées, ainsi que les protéines I κ B $_{\epsilon}$, Bcl-3, p100 et p105, et la protéine homologue de la drosophile, Cactus. Les protéines le plus fréquemment rencontrées sont I κ B $_{\alpha}$, I κ B $_{\beta}$ et I κ B $_{\epsilon}$. Ces protéines possèdent toutes 6 à 7 répétitions à ankyrines (ankyrin repeats), de 33 acides aminés chacune. La présence et la fonctionnalité de ces domaines est essentielle, car ce sont eux qui vont se lier aux domaines RHR hélicoïdaux, masquant dès lors la séquence NLS du dimère NF- κ B (**figure I.15**). Elles médient aussi l'inactivation de NF- κ B, car les protéines I κ B nouvellement synthétisées dans le cytoplasme vont à leur tour migrer dans le noyau (sans doute grâce à la présence d'une séquence NLS putative dans la séquence primaire d'I κ B), où elles fixeront les dimères NF- κ B présents dans le noyau, par un mécanisme de compétition. Ces complexes peuvent dès lors rejoindre le cytoplasme grâce à la présence d'une séquence NES (Nuclear Export Sequence) dans la séquence d'I κ B.

La phosphorylation des protéines I κ B reconnue par les ubiquitine ligases, mène à leur dégradation protéolytique par le protéasome.

• I κ B Kinase (IKK)

La kinase IKK active par phosphorylation les I κ B $_{\alpha}$ et I κ B $_{\beta}$ sur deux sérines. Son activité est induite rapidement par la liaison de cytokines et de LPS à leurs récepteurs, et la phosphorylation des 2 résidus s'effectue simultanément. Ces IKKs font partie d'un complexe de protéine kinases, d'une masse moléculaire de 700 à 900 kDa, appelé le signalosome. IKK $_{\alpha}$ et IKK $_{\beta}$ composent la partie catalytique du complexe. L'élément régulateur du complexe IKK est la protéine nommée IKK $_{\gamma}$ (48 kDa), ou NEMO pour NF- κ B essential modulator. Cette dernière protéine est une protéine de soutien, permettant le couplage d'IKK aux kinases activatrices en amont et est donc un régulateur essentiel de la phosphorylation d'I κ B.

Les protéines IKK $_{\alpha}$ et IKK $_{\beta}$ comportent 3 domaines majeurs :

- Un domaine kinase situé en position N-terminale
- Un domaine de tirette à leucine
- Et des motifs « helix-loop-helix » (HLH) (**Figure I.16**)

D'autres intervenants composent ce complexe : il s'agit des protéines MKP-1, MEKK1 et NIK. Dans le complexe, on retrouve la même proportion d'IKK $_{\alpha}$ d'IKK $_{\beta}$. La quantité relative d'IKK $_{\gamma}$ n'est pas encore clairement établie.

• Activation d'IKK

L'activation de cette protéine s'effectue par phosphorylation sur des sérines, en réponse à la stimulation au TNF- α et à l'IL-1, par la protéine IRAK, pour IL-1 receptor-associated kinase. Le motif HLH est aussi essentiel à l'activation d'IKK (Karin and Ben-Neriah 2000).

Plusieurs autres protéines sont impliquées dans l'activation d'IKK : on retrouve parmi celles-ci différentes isoformes de PKC, des MAPKKK, pour Mitogen-activated protein kinase kinase kinase, NIK (NF- κ B Inducing Kinase), Akt (ou PKB (Protein Kinase B)), MEKK 1, 2, et 3 (pour mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase), et TAK1 (TGF- β -activated kinase). La phosphorylation d'IKK par Akt pourrait jouer un rôle dans les voies de transduction du signal anti-apoptotiques attribuées à NF- κ B (voir paragraphe 2.2.2.2.c) (Karin and Ben-Neriah 2000).

L'étape limitante dans l'activation de NF- κ B est l'activité d'IKK, car une faible réduction dans l'activité de la kinase peut diminuer considérablement la dégradation d'I κ B (Karin and Ben-Neriah 2000).

• Inactivation d'IKK

Le mécanisme d'inactivation d'IKK n'est pas encore totalement élucidé, mais il semble que la plupart des stimuli activant la voie NF- κ B n'induisent qu'une activation transitoire du complexe IKK, et il a été remarqué qu'un signal fort, induit une réponse d'autant plus transitoire dans la cellule. Lors d'une stimulation au TNF- α , une première étape de régulation négative de l'activité d'IKK se produit par l'autophosphorylation d'IKK α et IKK β sur leurs régions C-terminales, riches en sérines. Cette hyperphosphorylation pourrait induire un changement conformationnel de la partie C-terminale, contenant les motifs HLH, dont le rôle est de médier la phosphorylation d'I κ B (Figure I.17).

D'autres hypothèses ont été émises afin d'expliquer cette inactivation. Parmi celles-ci, on suppose l'existence d'une phosphatase recrutée au niveau des régions C-terminales hyperphosphorylées, ce qui mènerait à la régulation de l'activité d'IKK. De plus, on n'exclut pas un système de régulation intégrant ces 2 hypothèses précédentes.

b) Voie d'activation classique de NF- κ B en réponse au LPS

Lorsque le LPS se fixe au TLR4, celui-ci est activé, et des protéines adaptatrices, telles que MyD88, s'y lient par l'interaction avec le domaine TIR du TLR4. IRAK s'associe à MyD88 activée, ce qui mènera aussi à son activation subséquente. IRAK activé, active à son tour TRAF6, qui active le complexe IKK. IKK activé va phosphoryler les protéines I κ B cytoplasmiques associées aux dimères NF- κ B, provoquant dès lors le recrutement d'ubiquitine ligases, ou E3. Celles-ci vont poly-ubiquitinyler les protéines I κ B sur des lysines, entraînant leur dégradation protéolytique par le protéasome 26 S. Le facteur de transcription est alors libéré, et sera transloqué dans le noyau par le biais de sa séquence NLS. Il se fixera sur des séquences consensus, localisées dans le promoteur des gènes dont il influence l'expression. Les différents dimères NF- κ B se caractérisent par des affinités différentes pour les sites κ B sur l'ADN, qui comportent les séquences consensus « 5'GGGRNNYYCC-3' » (avec R = purine ; G = pyrimidine et Y = n'importe quel nucléotide) (Karin and Ben-Neriah 2000; Kutuk and Basaga 2003; Tian and Brasier 2003) (Figure I.12).

En parallèle à cette voie d'activation classique des dimères NF- κ B, il existe d'autres voies d'activation secondaire.

c) Voies non classiques

L'activité transactivatrice de p65 et de c-Rel peut également être modulée via les voies des PKC atypiques, de Ras (petite protéine G liant le GTP), de Rac 1, des voies menant à l'activation des PI3Ks/Akt et de p38-MAPK. L'inhibition de ces voies provoque en général une diminution de la transcription des gènes cibles du facteur NF- κ B, bien que la translocation de celui-ci dans le noyau ne soit pas affectée. Cependant, l'étude de ces mécanismes de régulation de l'activation du facteur de transcription est plus complexe, car les acteurs intervenant lors du recrutement de la machinerie de transcription sont nombreux.

La régulation de l'activité transactivatrice se déroule principalement par phosphorylation de la sous-unité transactivatrice du dimère NF- κ B, p65. Par exemple, il a été noté que la PKA est liée aux dimères NF- κ B dans le cytoplasme. Lors d'un signal adéquat, induisant la dégradation protéolytique d'I κ B, la sous-unité catalytique de la PKA phosphoryle p65 sur une sérine en position 276 (dans le domaine « Rel » en position N-terminale). Cette

phosphorylation augmente considérablement l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription (Guha and Mackman 2001).

Un domaine de transactivation en position N-terminale sur les protéines p65 et c-Rel a été mis en évidence, et plusieurs acides aminés de ces domaines sont la cible de phosphorylations, dont les sérines en position 529, 536, et 471. Certains de ces acides aminés peuvent être phosphorylés via l'activation de la voie PI3K/Akt, lors d'une stimulation à l'IL-1 (Sizemore et al. 1999). Cette voie sera détaillée au paragraphe 2.2.2.2.

D'autres protéines interviennent dans la régulation de NF- κ B. On a récemment découvert que le phénotype d'une souris KO pour le gène codant pour la GSK-3 β (protéine cible de la voie d'activation de la PI3K) présente des similitudes avec le phénotype d'une souris KO pour le gène encodant la protéine p65 (Guha and Mackman 2001). En effet, des études récentes mettent en évidence le rôle positif de la GSK-3 β dans la voie d'activation de NF- κ B, menant à l'expression de marqueurs d'inflammation, tels que l'IL-6 (Ougolkov et al. 2005; Vines et al. 2006).

C'est aussi le cas par exemple des kinases MSK (pour Mitogen- and Stress-activated protein kinases), faisant partie de la famille des RSK, activées par la voie des MAPK (Ribosomal S6 kinase) (Frodin and Gammeltoft 1999). En effet, plusieurs équipes ont montré une activation des voies des MAPK/ERK, entraînant une activation des MSK. Ces protéines régulent positivement l'activité transactivatrice de NF- κ B par phosphorylation directe de p65 (Vanden Berghe et al. 2006).

Le facteur de transcription NF- κ B induit l'expression d'une pléthore de gènes cibles impliqués, pour la plupart d'entre eux, dans la réponse inflammatoire (Hashimoto et al. 2003). Etant donné la composante inflammatoire associée à l'athérosclérose, plusieurs équipes ont cherché à évaluer le rôle de NF- κ B dans ce contexte. On constate effectivement une activation accrue de ce facteur (ainsi qu'une augmentation de l'abondance des protéines encodées par les gènes contrôlés par NF- κ B) dans les lésions athérosclérotiques par rapport à des artères saines, et cela aussi bien dans les cellules endothéliales, que les CML et les macrophages (Brand et al. 1997; Kutuk and Basaga 2003).

Par ailleurs, les oxLDL, composants majeurs des plaques d'athéromes, montrent également une activité pro-inflammatoire, entre autres via l'activation de NF- κ B (Brand et al. 1997). L'activation de cette voie par les oxLDL est cependant controversée : des effets biphasiques de ces dernières ont été remarqués selon les concentrations utilisées. En effet, une concentration élevée en oxLDL pourrait inhiber la réponse inflammatoire induite par des agents inflammatoires classiques, tels que le LPS (Robbesyn et al. 2004).

d) Inhibition de la voie NF- κ B, le BAY 11-7082

La voie NF- κ B activant un grand nombre d'acteurs intervenant au cours de la réponse inflammatoire est donc une cible de choix pour la recherche d'agents thérapeutiques à activité anti-inflammatoires. L'ensemble des cibles sur lesquelles ont peut agir sont résumées dans le cas d'une stimulation à l'IL-1 dans la Figure I.18 (Renard and Raes 1999).

Parmi tous les inhibiteurs de NF- κ B décrits, le BAY 11-7082 est de plus en plus utilisé comme inhibiteur de référence. C'est un inhibiteur chimique à effets irréversibles sur la phosphorylation d'I κ B α et sur l'expression de gènes régulés par NF- κ B, dont les gènes encodant la E-sélectine, la molécule d'adhérence ICAM-1, avec un IC₅₀ de 10 μ M (**figure I.19**). L'IC₅₀ est défini comme la concentration à laquelle 50 % de l'inhibition de NF- κ B se produit (**figure I.19**). Cet agent inhibe de façon sélective la phosphorylation d'I κ B α induite par IKK après stimulation au TNF- α (Pierce et al. 1997).

Le BAY 11-7082 n'est pas cytotoxique pour les cellules endothéliales en culture (HUVEC) après 16 h d'incubation à une concentration de 10 μ M. De plus, l'efficacité

maximale est détectée après pré-incubation des cellules d'une heure en présence de l'inhibiteur. Cela suggère que cette molécule agit rapidement et de façon irréversible (Pierce et al. 1997).

Cette diminution de la phosphorylation pourrait être induite par l'inhibition de kinases en amont de l'activation d'I κ B α ou par le contrôle de l'activité de phosphatases.

L'effet inhibiteur du BAY 11-7082 a été rapporté dans d'autres types cellulaires, tels que les monocytes THP-1 (Gomez-Hernandez et al. 2005).

2.2.2.2 La voie PI3K-Akt

A côté des voies de signalisation aboutissant à l'activation de NF- κ B (**Figure I.13**), le LPS active également via le TLR4, la voie PI3K/Akt. En effet, Monick et son équipe ont montré sur un modèle de macrophages alvéolaires que cette voie était bien activée par le LPS (Monick et al. 2000; Monick et al. 2001). Nous allons d'abord présenter de manière générale les différents acteurs de cette voie. Nous verrons également qu'il existe des liens avec la voie NF- κ B.

La voie PI3K/Akt est activée par une série de stimuli différents (facteur de croissance, insuline, ...) et elle régule des fonctions cellulaires diverses telles que la prolifération et la croissance cellulaire, la survie, la différenciation et l'organisation du cytosquelette (Vanhaesebroeck and Alessi 2000).

Les protéines de la famille des PI3Ks phosphorylent des phospholipides membranaires, générant ainsi des messagers secondaires collaborant au recrutement en membrane de protéines activatrices, résidant dans le cytoplasme des cellules au repos, nécessaires à la transmission du signal.

a) Acteurs impliqués dans les voies d'activation des PI3Ks

• Les phosphatidyl inositols

Les phosphatidyl inositols (ou PtdIns) sont une classe de phospholipides membranaires constitués d'un acide phosphatidique sur lequel est fixé un groupe inositol (Vanhaesebroeck and Waterfield 1999). Tous les groupements -OH libres de l'inositol, à l'exception de ceux situés en position 2' et 6', peuvent être phosphorylés (Vanhaesebroeck and Alessi 2000).

Les principales formes phosphorylées des PtdIns sont les PtdIns(3)P, les PtdIns(3,4)P₂, les PtdIns(3,5)P₂, et les PtdIns(3,4,5)P₃ (ou PIP₃) (Vanhaesebroeck and Waterfield 1999).

• Famille des PI3Ks

Quatre classes de PI3Ks ont été identifiées. Elles se distinguent par les signaux qui les activent, et leurs localisations cellulaires (Woodgett 2001). Elles partagent une région homologue catalytique, reliée à un domaine nommé PIK, pour Phosphatidylinositol Kinase Homology, dont la fonction reste inconnue à ce jour (Vanhaesebroeck and Waterfield 1999).

1) PI3 Kinases de classe 1.

Ces protéines hétérodimériques sont composées d'une sous-unité catalytique de 110 kDa (p110) et d'une sous-unité régulatrice, p85. *In vivo*, le substrat le plus fréquemment utilisé par les PI3Ks de classe 1 est le PtdIns(4,5)P₂, ce qui mène à la production de PIP₃ ou PtdIns(3,4,5)P₃. Ce messager secondaire sera ensuite déphosphorylé en position 5' par une phosphatase cytoplasmique, menant dès lors à la formation de PtdIns(3,4)P₂. Seule cette classe de PI3K est capable d'activer la protéine PKB/Akt (Vanhaesebroeck and Alessi 2000).

Parmi les PI3Ks de classe 1, on peut encore distinguer 2 sous-groupes : les PI3Ks de classe 1a et les PI3Ks de classe 1b (**Figure I.20**).

a. PI3Ks de classe 1a.

Ces enzymes sont activées dans les voies de transduction du signal en aval des récepteurs à tyrosine kinase ou via des tyrosines kinases non-récepteurs, telles que les kinases de la famille Src, ou les JAK kinases. Les protéines de cette classe se caractérisent par la présence d'une sous-unité catalytique p110 liée à une protéine adaptatrice, à 2 domaines Src-homology-2, ou SH2. Ces domaines vont permettre aux PI3Ks de se lier aux résidus tyrosines phosphorylés - dans une séquence précise (phosphotyrosine-X-X-Méthionine) - des récepteurs activés ou de protéines adaptatrices recrutées par des récepteurs (**Figure I.21**) (Woodgett 2001).

On retrouve 3 isoformes de p110 dans le génome des mammifères p110 α , p110 β et p110 δ , encodés par des gènes différents, et au moins 7 protéines adaptatrices, dont p85 α , p85 β , p55 γ , encodées par 3 gènes distincts, mais subissant un épissage alternatif. Les isoformes p110 α , p110 β sont ubiquitaires dans l'organisme, par contre, on ne retrouve l'isoforme p110 δ que dans les leucocytes.

b. PI3Ks de classe 1b.

Les PI3Ks de cette classe agissent en aval de récepteurs couplés à des protéines G et à leurs protéines associées, telles que Ras (Vanhaesebroeck et al. 2005). Elles sont constituées de la sous-unité catalytique p110 γ , liée à la sous-unité régulatrice p85. Cette dernière sous-unité est responsable de la liaison de la PI3K aux sous-unités $\beta\gamma$ des récepteurs à protéines G.

On ne les retrouve que chez les mammifères et leur distribution dans l'organisme est limitée aux globules blancs (**Figure I.22**).

2) PI3 Kinases de classe 2.

Chez les mammifères, trois isoformes de ces protéines, de haut poids moléculaire (>170 kDa), ont été identifiés : PI3K-C2 α , β et γ . Les 2 premières formes sont ubiquitaires, tandis que l'isoforme PI3K-C2 γ est retrouvée principalement dans le foie. *In vitro*, les substrats reconnus par cette classe de PI3Ks sont les PtdIns, PtdIns(4)P et les PtdIns (4,5)P $_2$, avec certaines préférences : PtdIns > PtdIns(4)P >>> PtdIns (4,5)P $_2$. Les stimuli activateurs de ces protéines sont bien connus : l'insuline, l'EGF (Epidermal Growth Factor), des ligands d'intégrines, et la chémokine MCP-1.

3) PI3 Kinases de classe 3.

Ces protéines possèdent un homologue chez la levure, VpS34p. *In vitro*, Elles utilisent exclusivement des PtdIns, et elles génèrent probablement une fraction majeure de PtdIns(3)P détectés dans le cytoplasme. Cependant, les niveaux de PIP3 sont relativement constants et ne montrent pas d'augmentation rapide au cours des stimulations cellulaires, ce qui suggère une importance modérée des PI3Ks de classe 3 dans l'activation cellulaire.

4) Autres PI3 Kinases.

Ces enzymes possèdent un domaine kinase, homologue aux domaines catalytiques des PI3Ks. Parmi ces protéines, on retrouve par exemple mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) et DNA-PK (DNA dependent Protein Kinase). Un chapitre particulier sera consacré à mTOR (2.2.2.3).

• **Domaines protéiques de reconnaissance des phosphatidyl inositol**

Une fois phosphorylés, les PtdIns vont recruter et activer diverses protéines, et ce via deux domaines protéiques : il s'agit des domaines FYVE et des domaines « Pleckstrin homology » (PH). Les domaines FYVE lient spécifiquement les PtdIns(3)P, alors que les domaines PH lient les PtdIns(3,4)P₂ et les PIP₃.

Le domaine **FYVE** (FYVE correspond aux initiales des quatre premières protéines décrites pour contenir ce motif : **F**ab1p, **Y**OTB, **V**ac1, and **E**arly Endosome Antigen1) correspond à un motif de 60 acides aminés, avec 8 cystéines conservées, comme illustré à la figure I. 23 (Vanhaesebroeck and Waterfield 1999).

Le domaine **PH**, motif protéique globulaire d'une centaine d'acides aminés, lie de manière générale des phospholipides et certains PtdIns avec une haute affinité. On les retrouve chez tous les eucaryotes, dans une large gamme de protéines à activités diverses (kinases, phospholipases, protéines structurales, ...). Le domaine PH se compose de 2 feuillets-β, recouverts d'un côté par une hélice-α, comprenant un résidu tryptophane très conservé. Les résidus responsables de la fixation du PtdIns se trouvent en position N-terminale dans la chaîne peptidique, et forment le motif suivant : K-X₈₋₁₃-R/KXR-Hyd, où X est n'importe quel acide aminé et Hyd est un acide aminé hydrophobe. Les acides aminés essentiels à la fixation des lipides sont les acides aminés basiques, situés dans les feuillets-β. Ils ont été identifiés dans une série de protéines dont :

- des kinases (telles que PKB, PDK, ...)
- des « GTP Exchange factors » (VAV, Sos1, ...)
- des « GTPases-activating factors » (Gap1^m, ...)
- des phospholipases (PLCγ2)
- des protéines adaptatrices, ...

Nous nous focaliserons sur les kinases PKB/Akt (Vanhaesebroeck and Waterfield 1999).

b) Voies de transduction du signal activées par les PI3Ks de classe 1

Lors de la perception d'un signal extracellulaire, par exemple par un récepteur à tyrosine kinase, ce récepteur va être activé, et plusieurs protéines adaptatrices, dont IRS-1 (Insulin Receptor Substrate 1) intervenant dans la réponse cellulaire à l'insuline, se lient au récepteur et recrutent à leur tour des protéines transmettant le signal à d'autres protéines cibles. Parmi ces protéines recrutées par les protéines adaptatrices, on retrouve les PI3Ks, kinases dont le rôle est de phosphoryler des PtdIns insérés en membrane plasmique, générant des messagers secondaires, auxquels viendront se fixer d'autres protéines cytoplasmiques, dont les kinases PDK1 (3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1) et PKB/Akt (**Figure I.24**).

Dans les cellules au repos, PDK1 est localisée principalement dans le cytoplasme. Une fois les signaux perçus dans l'environnement extérieur, dont des facteurs de croissance, l'activation induit la translocation de cette protéine en membrane, où elle interagit avec les PtdIns(3,4)P₂/PIP₃ préférentiellement, à l'aide d'un domaine PH. Elle est aussi capable d'induire l'activation de protéines possédant un motif similaire en position C-terminale. On appelle ce groupe de protéines les AGC Ser/Thr Kinases. Font partie de ce groupe les kinases PKA, PKG, et PKC ainsi que les isoformes de PKB/Akt, la p70S6-kinase, et les p90 ribosomal S6-kinase (Vanhaesebroeck and Waterfield 1999) (**Figure I.25**).

PDK1 est une Ser/Thr kinase de 63 kDa exprimée dans tous les tissus de l'organisme. La liaison de PKB/Akt aux PtdIns(3,4)P₂/PIP₃ induit un changement de conformation de celle-ci : elle devient un substrat de PDK1, peut-être par l'exposition de la Ser 473 et de la Thr 308. Le mécanisme de phosphorylation d'Akt par PDK1 ne semble pas encore totalement élucidé, car PDK lié au PtdIns(3,4)P₂/PIP₃ ne phosphoryle que la thréonine 308. Une autre PDK1

modifiée et complexée à d'autres protéines, nommée PDK2, devrait assurer la phosphorylation de la sérine 473 (Vanhaesebroeck and Waterfield 1999).

La protéine PKB (protéines kinase B), de 57 kDa, tire son nom des protéines PKC et PKA. Elle trouve son homologue structurel dans l'oncoprotéine v-Akt, d'où son nom « Akt ». Elle possède un domaine PH en position N-terminale, un domaine catalytique kinase, ainsi qu'une région régulatrice en position C-terminale (**Figure I.25**). Elle lie préférentiellement les PIP3 et les PtdIns(3,4)P₂.

Chez les mammifères, il existe 3 isoformes de cette protéine, PKB_α, PKB_β et PKB_γ, encodées par 3 gènes différents. Ces protéines sont fortement semblables : en effet, PKB_β et PKB_γ montrent 81 et 83 % d'homologie avec PKB_α (Vanhaesebroeck and Alessi 2000). Toutes les trois sont distribuées de façon ubiquitaire dans les cellules de l'organisme. L'activation de PKB/Akt s'effectue, comme déjà mentionné, par phosphorylation de 2 acides aminés situés dans le domaine C-terminal, la thréonine 308 et la sérine 473. Akt phosphorylé va alors se détacher de la membrane, migrer dans le cytosol, phosphoryler une large gamme de protéines cellulaires, comme illustré dans la Figure I. 26. Parmi les substrats de PKB, signalons, les protéines IRS-1, l'eNOS, et la protéine mTOR. PKB inactive également par phosphorylation la kinase GSK3. Enfin, PKB pourrait activer le facteur NF-κB en phosphorylant le complexe IKK, même si les mécanismes exacts restent non identifiés, ainsi (Vanhaesebroeck and Waterfield 1999; Vanhaesebroeck and Alessi 2000; Guha and Mackman 2001; Vanhaesebroeck et al. 2005).

• Substrats de PKB/Akt

La voie de transduction du signal menant à l'activation de la PI3K a été surtout étudiée dans le contexte d'une stimulation à l'insuline et de la régulation de la survie cellulaire (**Figure I.26**)

En général, le rôle de PKB/Akt est de retarder la mort cellulaire, et cela via la régulation de divers mécanismes cellulaires, dont la régulation de l'expression de protéines anti-apoptotiques, et l'inhibition de protéines pro-apoptotiques, telles que la caspase-9 et BAD. Elle phosphoryle aussi plusieurs autres cibles régulant la survie cellulaire, dont mTOR et la GSK3β (Glycogen synthase kinase 3β). Cette protéine intervient aussi dans la régulation de l'activité de la eNOS (endothelial Nitric Oxyde Synthase) et de MDM2.

La régulation de la survie cellulaire passe aussi par l'activation de facteurs de transcription, dont NF-κB. Certaines recherches ont montré une phosphorylation d'IKK par PKB/Akt, provoquant alors la dégradation d'IκB. NF-κB migre alors dans le noyau, où il peut induire la transcription de gènes cibles encodant des protéines anti-apoptotiques, telles que les protéines c-IAP1 et c-IAP2, pour « Inhibitor of apoptosis ». Le mécanisme précis n'est cependant pas encore clairement compris.

Nous verrons plus tard que la voie PI3K/Akt module également de manière positive une kinase centrale dans le contrôle de la croissance cellulaire.

• Rôle des phosphatases ciblées sur les PtdIns phosphorylés.

L'action des PI3Ks est aussi régulée de manière négative par déphosphorylation des PtdIns phosphorylés. Cette déphosphorylation est médiée entre autres par les 3'-phosphatases PTEN (phosphatase, and tensin homologue deleted on chromosome ten) qui convertissent les PtdIns(3,4,5)P₃ en PtdIns(4,5)P₂ et les PtdIns(3,4)P₂ en PtdIns(4)P. SHIP1 et SHIP2 (Src-homology 2 domain-containing inositol 5' phosphatase), sont des 5-phosphatases qui convertissent les PtdIns(3,4,5)P₃ en PtdIns(3,4)P₂.

PTEN est un suppresseur de tumeurs, dont on retrouve très couramment des formes inactives dans certains cancers (Fresno Vara et al. 2004).

c) Inhibiteurs de la PI3K

Les deux inhibiteurs chimiques de PI3K, couramment utilisés en biologie et dans ce mémoire sont le LY294002 et la wortmannine. Bien que leurs structures moléculaires ne sont pas comparables, ils possèdent des caractéristiques communes. La membrane plasmique leur est perméable. Ils possèdent un faible poids moléculaire, et ils sont spécifiques à faible dose (Vanhaesebroeck and Waterfield 1999). Leurs sites de liaisons aux PI3Ks sont distincts : la wortmannine se lie de façon covalente aux sous-unités catalytiques, alors que le LY294002 inhibe le site de phosphorylation des PI3Ks.

Toutes les classes de PI3Ks décrites ci-dessus présentent une sensibilité semblable à ces inhibiteurs chimiques. Par contre, les effets de la wortmannine et du LY294002 sur les PI3Ks de classe IV ont été moins bien caractérisés : Il semblerait que mTOR et DNA-PK sont inhibés de la même façon que les PI3Ks communes par le LY294002, mais l'effet de la wortmannine sur ces protéines est 10 fois moindre que l'effet observé sur les PI3Ks des classes 1, 2 et 3.

Il est important de signaler l'instabilité de la wortmannine en phase aqueuse et sa capacité à interagir avec les protéines sériques. Il est donc difficile de confirmer les effets de cet inhibiteur lors de son administration à des tissus ou à des cellules pendant de longues périodes (Vanhaesebroeck and Waterfield 1999).

La quercétine, analogue chimique du **LY294002** et composé naturel de la famille des bioflavonoïdes, a montré précédemment une activité inhibitrice envers les PI3Ks, et cela à une IC_{50} de 3,8 μ M. Cette molécule semble aussi bloquer le site de phosphorylation des PI3Ks. En revanche, la quercétine inhibe d'autres kinases. Dès lors, d'autres molécules similaires ont été investiguées, dont le 2-(4-morpholinyl)-8-phényl-4H-1-benzopyrane-4-one, ou LY294002 (**figure I.27**). L' IC_{50} de cet inhibiteur se situe aux alentours de 1,4 μ M (Vlahos et al. 1994). Il s'agit comme un inhibiteur compétitif spécifique pour le site de liaison à l'ATP des PI3Ks. De plus, la liaison du LY294002 ne dépend pas de l'état de phosphorylation de l'enzyme ciblée (Vlahos et al. 1994).

La **wortmannine** est un inhibiteur chimique non compétitif de la classe des viridines, furanes stéroïdaux. Elle se lie irréversiblement dans le site actif des PI3Ks, précisément à l'endroit de liaison de l'ATP, ainsi qu'à d'autres protéines kinases (Cortot et al. 2006) (**Figure I.28**). Cette molécule a été isolée du champignon *Penicillium wortmanni*, et est à la base d'un agent anti-fongique à propriétés antibiotiques (Arcaro and Wymann 1993; Powis et al. 1994; Wipf and Halter 2005). L' IC_{50} est comprise entre 2 et 4 nM.

La wortmannine interagit avec une large gamme de protéine kinases, mais *in vitro*, elle se lie de façon covalente à la lysine en position 802 de la sous-unité catalytique p110, site essentiel à la liaison de l'ATP et à la réaction de transfert du phosphate au substrat. L'inactivation des PI3Ks par cet inhibiteur pharmacologique dépend directement du temps et de la dose utilisés (Powis et al. 1994).

D'autres cibles majeures de la wortmannine sont les Polo-like Kinase (PLK1), jouant un rôle dans le cycle cellulaire, et la Myosin Light Chain Kinase (MLCK), mais à une concentration de 0,2 μ M (Wipf and Halter 2005).

2.2.2.3 La voie mTOR/FRAP

Cette voie de transduction du signal intervient dans des processus essentiels à la cellule, régulant sa croissance, sa division, via le contrôle de la synthèse protéique. Ce contrôle est réalisé grâce au ciblage précis d'une large gamme d'effecteurs enzymatiques, comme des protéines ribosomales, des facteurs d'initiation de la traduction, ... (Hay and Sonenberg 2004) (**Figure I.29**).

Récemment, Potter et son équipe (2001) ont observé que cette voie était activée dans des macrophages stimulés au LPS (Potter et al. 2001).

a) Description de la protéine mTOR

Saccharomyces cerevisiae possède deux gènes dont l'expression est sous le contrôle de la présence de rapamycine, TOR1 et TOR2 (Hay and Sonenberg 2004). Leur homologue mammalien est une protéine de haut poids moléculaire nommée mTOR (mammalian Target of Rapamycin), ou FRAP (pour FKBP-rapamycin-associated protein), ou RAFT1 (rapamycin and FKBP target), ou RAPT1 (Rapamycin Target). On retrouve plusieurs domaines protéiques dans la séquence de cette protéine dont (Figure I.30):

- En position N-terminale, 20 répétitions en tandem du même motif HEAT (Huntignton, EF3, A subunit of PP2A, TOR1). Chacun d'eux est composé de 2 hélices- α anti-parallèles, de 40 acides aminés. On les retrouve dans un grand nombre de protéines, où ils médient des interactions entre protéines (Hay and Sonenberg 2004; Proud 2004).

- Un grand nombre de domaine FAT (FRAP, ATM (Ataxia-Telangiectasia-mutated), TRAP (tartrate-resistant acid phosphatase)), couramment retrouvés dans des kinases semblables aux PI3Ks. Un motif FAT se situe en position C-terminale, appelé FATC, et est essentiel à l'activité catalytique de mTOR.

- Le site catalytique de la protéine situé dans la partie C-terminale. Sa séquence présente des similitudes avec la séquence peptidique du domaine catalytique des PI3Ks. Cependant, aucune phosphorylation de lipides par mTOR n'a été décrite dans la littérature.

- Le domaine FRB en amont du domaine catalytique, site de liaison du complexe FKBP12-rapamycine (Proud 2004). Ce complexe va affaiblir les liens entre mTOR, Raptor (homologue de KOG1 chez la levure (Kontroller of Growth-1)) et G β 1 (G protein β -subunit-like protein). La liaison de la rapamycine à mTOR entraîne son incapacité à recruter ses divers substrats (Sarbasov et al. 2005).

- Le domaine responsable de la régulation négative de l'activité de mTOR (NRD) situé entre le domaine catalytique et le domaine FATC (Hay and Sonenberg 2004).

Pour estimer l'activité de mTOR, on suit la phosphorylation de ses deux cibles majeures, 4E-BP1 (facteur d'initiation eucaryotique de la traduction 4E-Binding Protein 1), aussi nommé PHAS1, et p70-S6K1 (S6 Kinase 1).

b) Voies de signalisation liées à mTOR

Chez la levure, les deux protéines TOR sont activées lorsqu'elles se trouvent dans un environnement riche en composés azotés, tels que la glutamine. De plus, l'entrée de glucose est aussi régulée par la voie d'activation de TOR chez ce même organisme (Rowinsky 2004).

Chez les métazoaires, le contrôle de cette activation est plus complexe et les signaux perçus simultanément par la cellule sont intégrés dans un ensemble, menant à l'activation de mTOR. Ces signaux peuvent correspondre à la fixation de cytokines, de facteurs de croissance, tout en percevant de même les ressources nutritives à disposition. Cette voie de perception des nutriments a donc évolué, et s'est intégrée aux voies de transduction du signal complexes présentes chez ces organismes.

Les voies de signalisations impliquant mTOR sont complexes et nous ne les décrivons que succinctement (Figure I.31).

mTOR peut interagir avec diverses protéines pour former deux complexes multi-protéiniques principaux :

- le complexe mTOR/G β L/Raptor, sensible à la rapamycine ;

- le complexe mTOR/GβL/Rictor, insensible à la rapamycine et dont la régulation reste encore mal connu.

• Le complexe Raptor/mTOR (Figure I.30)

Ce complexe répond aux nutriments et aux facteurs de croissance principalement via les régulateurs TSC1/2 et Rheb.

L'hétérodimère TSC1/TSC2 (hamartine/tubérine) (pour Tuberous Sclerosis Complex 1 et 2), est une « GTPase activating protein » (GAP) pour la petite protéine G Rheb, qui se lie directement à Raptor/mTOR et l'active. Les protéines TSC1/2 sont elles-mêmes régulées positivement par phosphorylation de TSC2 (Hay and Sonenberg 2004; Sarbassov et al. 2005). Par exemple, en cas de déprivation énergétique, le rapport AMP/ATP augmente, ce qui active l'AMPK qui phosphoryle TSC2, stimulant l'activité GTPasique de TSC1/2, inhibant ainsi Rheb et le complexe Raptor/mTOR (Figure I.32).

D'autres kinases, dont les kinases ERK, RSK-1, PKB/Akt inhibent TSC2 par phosphorylation, ce qui active Rheb et donc le complexe Raptor/mTOR. Quand Raptor/mTOR est activé, il phosphoryle des protéines qui jouent un rôle actif dans la traduction et dans la transcription (Figure I. 31).

Plusieurs composants de la machinerie de traduction sont des cibles directes ou indirectes de mTOR, comme des facteurs d'initiation, tels que eIF4B, eIF4G, eIF4E et 4E-BP1, de même que des protéines ribosomales, telles que S6 (Hay and Sonenberg 2004) (Figure I.32). Par exemple, la protéine 4E-BP1 interagit lorsqu'elle se trouve sous forme hypophosphorylée, avec des facteurs d'initiation de la traduction, tels qu'eIF4G, inhibant ainsi l'initiation de celle-ci. mTOR activé va phosphoryler 4E-BP1. Ces protéines hyperphosphorylées vont alors se détacher des facteurs d'initiation et la traduction protéique peut s'initier (Figures I.33 et 34). Quant à la S6 Kinase, une Ser/Thr kinase, elle régule la croissance cellulaire, via l'augmentation de la traduction d'une classe d'ARN messagers particuliers, caractérisés par une chaîne d'oligo-pyrimidine à l'extrémité 5' (dit 5' TOP ARNm). Ce type d'ARNm messenger encode des protéines telles que des protéine ribosomales, des facteurs d'élongation, ... (Cortot et al. 2006). Lorsque mTOR est activé en présence de nutriments, les S6 kinases activent par phosphorylation la protéine ribosomale S6. Cette protéine est particulièrement impliquée dans le recrutement de la partie 5' des ARNm aux ribosomes (Proud 2004). Certaines études récentes ont montré une influence de la rapamycine sur l'activité d'enzymes impliquées dans la transcription, telles que des polymérases (Hay and Sonenberg 2004).

Signalons que Potter et son équipe (2001) ont également observé la phosphorylation de 4E-BP1 dans des macrophages stimulés avec du LPS. Ces auteurs démontrent également que cette phosphorylation est bien dépendante de la voie Raptor/mTOR.

Cette voie pourrait donc contribuer au contrôle traductionnel de l'expression génique des cytokines dans ce type cellulaire (Potter et al. 2001).

• Le complexe Rictor/mTOR

La régulation de ce complexe est beaucoup moins connue, mais on sait qu'il régule la voie PKB/Akt par phosphorylation. Celle-ci faciliterait la phosphorylation de PKB/Akt par la PDK1. Ce complexe régulerait aussi l'organisation du cytosquelette, via des mécanismes encore peu connus, impliquant la TSC2 et la petite protéine G Rho.

c) La rapamycine, inhibiteur de la voie mTOR/FRAP

La rapamycine, antibiotique de la famille des macrolides, ou *sirolimus*, est issue d'une souche bactérienne, *Streptomyces hygroscopicus*, et possède des activités anti-fongiques. En présence de lymphocytes T, elle possède une activité immunosuppressive. En effet, les cellules restent bloquées en phase G₁. L'IC₅₀ de la rapamycine est compris entre 1 et 9 nM (Nelson et al. 1999). La rapamycine se lie à un récepteur intracytoplasmique de la famille des immunophilines, appelés FKBP12 (pour FK506 Binding Protein). Le FK506, ou tacrolimus, est une autre molécule, issue d'un *streptomyces*, utilisé comme immunosuppresseur.

La rapamycine inhibe le complexe protéique formé par les protéines FK506-binding protein ou FKBP12, lié à la région C-terminale de TOR, nommée FRB (FKB12-rapamycin-binding) (Figure I.35) (Vignot et al. 2005).

La rapamycine n'inhibe donc pas toutes les fonctions de mTOR, car elle n'inhibe que les complexes possédant la protéine Raptor (regulatory associated protein of mTOR).

3 Les cardénolides

Nous terminerons cette introduction par un court chapitre sur les cardénolides, car certaines de ces molécules pourraient exercer des effets anti-inflammatoires, en inhibant NF-κB.

Les cardénolides sont des glycosides, à propriétés cardiotoniques, comme ceux extraits à partir de la digitaline. Les cardénolides les plus connus sont la digoxine et l'ouabaine (Melero 2000). Ce sont en premier lieu des inhibiteurs non compétitifs et allostériques des Na⁺/K⁺-ATPases, qui exercent un effet inotrope positif, lors de l'administration à faibles doses. Ces composés naturels sont extraits à partir de végétaux. Ils portent un groupement aglycone, sur lequel se lie en position C-3 un ou plusieurs sucres, ainsi qu'un groupement hydroxyl en position C14β sur la partie stéroïdienne (figure I.36)

L'addition de sucres aux cardénolides modifie aussi bien leurs propriétés pharmacocinétiques que pharmacodynamiques. En effet, les cardénolides ne portant pas de sucres sont absorbés plus rapidement que les composés portant un à plusieurs sucres. Une grande variété de sucres peut être ajoutée: monomères de glucose, galactose, mannose, et rhamnose.

Les ponts hydrogènes formés entre le composé et la Na⁺/K⁺ATPase engendrent un changement conformationnel de cette dernière, entraînant une diminution de l'affinité de l'enzyme pour son substrat, l'ATP (Melero 2000).

Calotropis procera est une espèce végétale pour laquelle on rapporte plusieurs propriétés thérapeutiques, telles que des activités anti-fongiques, anti-bactériennes, anti-cancéreuses, ... La firme pharmaceutique « Unibioscreen » s'est intéressée à des glycosides cardiotoniques extraits et purifiés à partir de *C. procera*. Parmi ces composés, l'un d'eux, la 2-oxovoruscharine (C₃₁H₄₁NO₉S), a montré une activité anti-tumorale particulièrement intéressante. Des procédés d'hémisynthèses ont conduit à la production de 9 sous-produits. Parmi ceux-ci, le composé 23 a montré des propriétés anti-tumorales, ainsi qu'une colocalisation avec la Na⁺/K⁺-ATPase (Van Quaquebeke et al. 2005) (Figure I.37). Ce composé n'influence ni le réseau de microtubules, ni l'activité de la topoisomérase. Des travaux de recherche préliminaires suggèrent un autre mécanisme d'action via la voie de transduction du signal menant à l'activation de NF-κB (Van Quaquebeke et al. 2005). D'autres recherches portant sur d'autres cardénolides ont aussi montré une influence de la liaison de cardénolides (tels que l'ouabaine) à la pompe à sodium et sur la voie d'activation de NF-κB. Pour expliquer l'inhibition de la voie NF-κB en présence des cardénolides, une hypothèse a donc été proposée : l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire, due à la

dérégulation de la pompe à sodium, activerait certaines phosphatases (comme la calcineurine) dont on sait qu'elles induisent la déphosphorylation d'I κ B α (Mijatovic et al. 2006).

Des cellules cancéreuses présentent une activité basale non négligeable de la voie NF- κ B, et celle-ci peut provenir de différents dysfonctionnements dans son métabolisme (hyperactivation d'un des composants (comme IKK), mutations dans les protéines, ou dans d'autres éléments régulateurs). Cette activité constitutive pourrait jouer un rôle dans la résistance des tumeurs à la mort cellulaire naturelle et induite par des inhibiteurs chimiques. Mijatovic et son équipe (2006) ont trouvé que les cellules A549 présentent une activité constitutive élevée de NF- κ B. Ils ont testé un cardénolide dans ce modèle cellulaire, l'UBS 1450, et observent bien une activité anti- NF- κ B, la molécule inhibant la liaison à l'ADN de p65.

4 Objectifs du mémoire

Maladie à caractère inflammatoire liée à la présence de cellules du système immunitaire, dont les macrophages dans la paroi artérielle, l'athérosclérose est une pathologie multifactorielle, dont l'initiation et le développement sont le résultat d'un ensemble d'agressions diverses de la paroi artérielle.

L'induction de cette réponse inflammatoire est principalement due à la rétention lipidique, via les LDL modifiées s'accumulant dans l'intima. Ces lipoprotéines modifiées vont entraîner une réponse inflammatoire des cellules de la paroi artérielle, provoquant dès lors la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires, activant ces mêmes cellules. La réaction inflammatoire chronique est déclenchée. Cette hypothèse de la rétention lipidique n'est pourtant pas la seule pour expliquer le développement des maladies cardio-vasculaires. En effet, un grand nombre d'études confirment la présence significative de résidus bactériens, tels que le LPS, dans des plaques d'athéromes avancées. Ces découvertes suggèrent donc que les infections systémiques peuvent jouer un rôle non négligeable dans le développement de l'athérosclérose, voire dans l'initiation de celle-ci.

C'est pourquoi, dans le cadre de ce mémoire, nous tacherons d'analyser la réponse inflammatoire dans un modèle en culture de monocytes/macrophages stimulés au LPS. Plusieurs voies de transduction du signal sont impliquées dans la réponse cellulaire à des médiateurs inflammatoires, mais dans la réponse cellulaire au LPS, la voie menant à l'activation du facteur de transcription NF- κ B est centrale.

Dans la première partie de ce mémoire, nous aborderons un travail plus appliqué, en collaboration avec Unibioscreen (Bruxelles), qui consistera à évaluer les propriétés anti-NF- κ B, de 3 molécules en cours de développement et qui appartiennent à la famille des cardénolides. Mijatovic et ses collaborateurs (2006) ont montré que certaines de ces molécules inhibaient NF- κ B dans un modèle de cellules de carcinome de poumon en culture. L'objectif de cette première partie était d'évaluer les propriétés anti-NF- κ B de trois cardénolides dans un modèle plus relevant par rapport au contexte de l'inflammation, les monocytes/macrophages humains THP-1, simulés ou non avec du LPS (Mijatovic et al. 2006).

La deuxième partie de ce mémoire est plus fondamentale et vise à décortiquer la signalisation induite par le LPS dans les monocytes/macrophages. En effet, si la voie NF- κ B est bien centrale dans la signalisation induite par le LPS, comme mentionné ci-dessus, il existe d'autres voies connexes, telles la voie PI3K/Akt, qui peuvent en outre moduler l'activation de NF- κ B. La voie PI3K/Akt à son tour, présente elle-même des interconnexions

avec la voie mTOR. Les contributions spécifiques de ces différentes voies restent mal établies. Afin de mieux appréhender les réponses inflammatoires et de pouvoir ainsi mieux cibler les acteurs principaux de ces voies pour des approches thérapeutiques, il est donc essentiel d'évaluer le rôle respectif de chacune de ces voies.

Dans ce but, dans un travail préliminaire, nous exploiterons des inhibiteurs chimiques reconnus pour être relativement spécifiques : il s'agit du BAY 11-7082, inhibiteur de la voie NF- κ B, du LY294002 et de la wortmannine pour inhiber la voie PI3K, et de la rapamycine pour inhiber la voie mTOR.

Pour évaluer les effets de ces inhibiteurs sur la réponse induite par le LPS, nous utiliserons un modèle de macrophages murins, bien décrit dans la littérature et dans notre laboratoire. Nous analyserons dans un premier temps les effets de ces inhibiteurs sur l'activation du facteur de transcription NF- κ B. Nous testerons son activation de 2 manières différentes. Sa liaison à l'ADN sera déterminée à l'aide d'un test Trans-AM®. En parallèle, nous nous intéresserons à l'activité transactivatrice de ce facteur de transcription, en transfectant les macrophages avec un plasmide rapporteur, contenant un promoteur synthétique avec plusieurs séquences consensus de liaison pour NF- κ B, en amont d'un gène rapporteur, le gène encodant la luciférase.

Dans un deuxième temps, nous nous intéresserons plus particulièrement aux profils d'expression génique de ces cellules stimulées au LPS, pré-incubées ou non en présence de ces inhibiteurs. Pour cela, nous utiliserons la technologie des damiers à ADN, et plus particulièrement la DualChip® Mouse Inflammation, conçue pour mesurer l'expression de gènes spécifiquement impliqués dans la réponse inflammatoire (collaboration avec EAT, Namur).

Nous pourrions ainsi voir les effets de chaque inhibiteur sur l'expression des gènes régulés par le LPS, ce qui devrait nous permettre de mieux comprendre l'importance relative des différentes voies de signalisation induites par le LPS et de préciser leur rôle dans la régulation d'une série de gènes clefs de l'inflammation.

2. Matériels et Méthodes

Matériels et méthodes

1 Culture cellulaire

Dans le cadre de ce mémoire, les modèles cellulaires utilisés sont, d'une part les cellules monocytaires humaines THP-1, et d'autre part les macrophages murins RAW 264.7.

1.1 Matériels

- Cellules monocytaires THP-1 et macrophages murins RAW 264.7 (American Type Culture Collection - ATCC)
- Boîtes de cultures stériles de 25 cm² (T25) et de 75 cm² (T75) (Costar)
- Milieux de culture pour monocytes THP-1 et pour macrophages murins RAW 264.7 (**tableau II.1**)
- Pipettes de 5, 10 et 25 ml stériles (Sarstedt)
- Tubes de 10 et 50 ml stériles (Sarstedt)
- Étuve à 37°C, 5% de CO₂ (Jouan).

- Chambre de Neubauer (Vel)
- Centrifugeuse labofuge 400R (Heraeus)
- Microscope inversé (Diavert)
- Solution de Bleu de trypan à 4% (Sigma)
- Rateau de 30 cm stérile (Techno Plastic Products - TPP).
- Phorbol Myristate Acétate (PMA) (Calbiochem)
- Phosphate buffer Saline (PBS) 10 mM PO₄⁻, NaCl 150 mM, pH 7,4

1.2 Méthode

1.2.1 Culture des monocytes THP-1

Cette lignée cellulaire est issue d'un échantillon de sang périphérique d'un patient atteint d'une leucémie monocyttaire. Elle possède plusieurs caractéristiques propres aux monocytes humains (Tsuchiya et al. 1980) (**Figures II.1**).

La culture de ces cellules s'effectue dans des T75 et il est nécessaire de les repiquer en milieu stérile tous les 3 jours. Les cellules se divisant restent attachées, formant ainsi des grappes. La culture est à confluence lorsque des cellules commencent à se détacher de ces grappes. A ce stade, il y a environ 700.000 cellules par ml de milieu. Les cellules sont prélevées et centrifugées 7 minutes à 1000 rpm à température ambiante (RT°). Entre temps, le comptage des cellules par ml de suspension cellulaire est effectué grâce à l'utilisation d'une chambre de Neubauer (**figure II.2**). Le culot de cellules est resuspendu à 3 millions de cellules par ml dans du milieu frais et un volume de 1 ml, contenant 3 millions de cellules, est ajouté à 14 ml de milieu chaud dans une nouvelle T75. Enfin, les cultures cellulaires sont conservées dans une étuve à 37°C sous 5 % de CO₂.

Les stimulations s'effectuent dans des boîtes stériles (3 millions de cellules par T25, et 10 millions de cellules par T75). Une demi-journée avant la stimulation, les cellules sont rincées au PBS chaud, et mises au repos en présence d'un milieu frais à 1 % de sérum décomplémenté.

Les monocytes peuvent être différenciés *in vitro* en macrophages lors d'une incubation au PMA 0,6 µM dans le milieu complet pendant 24 h. Les cellules deviennent alors adhérentes et on observe qu'elles forment des pseudopodes. Après cette incubation, les cellules sont rincées au PBS et le milieu est renouvelé.

1.2.2 Culture des macrophages murins RAW 264.7

Cette lignée de cellules phagocytaires de souris mâles, provient d'une tumeur induite par le virus de la leucémie murine d'Abelson (A-MuLV) (Raschke W.C. 1978) (**figures II.3**).

Les cellules sont repiquées tous les deux jours à raison de 3 millions de cellules par nouvelle boîte de culture contenant 20 ml de milieu complet. D'abord, 10 ml de milieu de culture sont éliminés. Les cellules sont alors raclées dans les 10 ml de milieu restant. La culture est renouvelée par addition dans une T75 de 19 ml de milieu complet et de 1 ml de suspension cellulaire. Les cellules sont cultivées à 37°C sous 5 % de CO₂.

Comme pour les THP-1, les RAW 264.7 sont mises au repos une demi-journée avant stimulation. Le milieu de culture est alors renouvelé par du milieu pour RAW 264.7, mais à 1 % de sérum, après rinçage au PBS stérile.

Les monocytes THP-1 et les macrophages RAW 264.7 sont conservés à long terme à –196°C dans le milieu de culture approprié au type cellulaire, contenant 5 % de DMSO (conteneur à azote liquide).

2 Evaluation de la cytotoxicité de molécules exogènes

La cytotoxicité de molécules nouvellement testées peut être évaluée de différentes façons. La méthode utilisée dans ce mémoire est la méthode au MTT, pour bromure de 3,(4,5-diméthyl-thiazol-2-yl)diphényltétrazolium). En effet, les cellules métaboliquement actives incorporent le MTT, et le clivent en son dérivé formazan. Cette transformation est effectuée par certaines enzymes mitochondriales, telles que la succinate déhydrogénase (**Figure II.4**). Le formazan ainsi formé cristallise en phase aqueuse et donne une couleur mauve.

2.1 Matériels

-Cellules repiquées en plaques 24 puits (Costar), la veille de la stimulation dans 1 ml de milieu à 1 % de sérum.
-MTT (dilué à une concentration de 2,5 mg/ml dans du PBS) (Sigma)

-PBS
-Solution de lyse (**Tableau II.2**)
-Lecteur de plaques 24 puits (Ultramark, BioRad)

2.2 Méthode

Les cellules sont stimulées 6 heures en présence des molécules dont la cytotoxicité est à évaluer. A la fin de la stimulation, 500 µl par puits de solution de MTT diluée sont ajoutés au milieu de culture. Les cellules sont alors incubées 2 heures à 37°C sous 5 % de CO₂, afin qu'elles incorporent le MTT. Après cette étape d'incorporation, le milieu cellulaire contenant le colorant est éliminé, et 1 ml de solution de lyse est ajouté à chaque puits. La lyse cellulaire s'effectue une nuit à 37°C, sous agitation constante. Le lendemain matin, la densité optique à 570 nm est lue à l'aide d'un lecteur de plaques. Les résultats sont exprimés en pourcentage de survie par rapport aux cellules contrôle.

3 Analyse de l'activation de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription

Au cours de ces expériences, nous allons pouvoir mettre en évidence la liaison d'un facteur de transcription à sa séquence consensus sur l'ADN. Tout d'abord, nous allons décrire les étapes d'extraction protéique.

3.1 Extraction des protéines nucléaires

Il existe deux types différents de protocoles d'extraction protéique : celui pour les cellules adhérentes et celui pour les cellules en suspension. Cependant, les réactifs utilisés sont les mêmes pour les types cellulaires. Pour les cellules en suspension, chaque étape de rinçage est suivie d'une centrifugation de 5 minutes à 1000 rpm, afin de décanter les solutions utilisées d'étape en étape.

3.1.1 Matériels

- | | |
|--|--|
| -Propipette (Macro, Bret) | -Racloir (Techno Plastic Products -TPP). |
| -Pompe à vide | -Centrifugeuse à 4°C pour micro-tubes 5415 R (Eppendorf) |
| -NaCl (Merck) | -PBS |
| -NaF (Merck) | -PBS + Na ₂ MoO ₄ 1 mM et de 5 mM de NaF (Merck) |
| -Na ₂ MoO ₄ (Sigma) | -Tampon RE (Tableau II.3) |
| -Hypotonic buffer 2 x (Tableau II.3) | -Tampon SA (Tableau II.3) |
| -Tampon de lyse HB 1 x 10 %, 0,5 % NP-40 (Sigma) | |

3.1.2 Méthode

Cette manipulation s'effectue toujours sur glace afin d'arrêter toute réaction enzymatique qui pourraient encore se produire après notre temps de stimulation.

Les cellules cultivées en T25 sont d'abord rincées à l'aide de 3 ml de PBS froid. Après décantation à la pompe à vide, les cellules sont de nouveau rincées avec 3 ml de PBS complété de 1 mM de Na₂MoO₄ et de 5 mM de NaF. On ajoute ensuite 3 ml d'un tampon hypotonique 1 x pendant 5 minutes. Les cellules vont alors gonfler sous l'effet de l'Hepes, du Na₂MoO₄, du NaF et de l'EDTA. Après décantation du liquide dans chaque boîte, 300 µl de tampon de lyse à 0,5 % de NP-40 sont ajoutés sur les cellules. Le lysat cellulaire est alors récolté et transféré dans un micro-tube, qui sera centrifugé 30 secondes à 13000 rpm. Après centrifugation, nous conserverons le culot que nous resuspendrons dans un mélange de tampon de resuspension RE et SA (1:1). La resuspension du culot est optimisée par un passage sur roue à 4°C d'au moins 30 minutes. Les échantillons sont ensuite centrifugés 10 minutes à 13000 rpm. Les surnageants sont fractionnés en vue d'un dosage protéique à la méthode du Bradford et conservés à -80°C.

3.2 Dosage de protéines par la méthode de Bradford

Pour doser les protéines, nous avons utilisé la méthode mise au point par Marion Bradford en 1976. Ce dosage présente de nombreux avantages, comme sa rapidité, sa simplicité, sa sensibilité et son coût dérisoire. Il est de plus très spécifique pour les protéines.

3.2.1 Matériels

- | | |
|--|---|
| -Tubes en polypropylène (Kartell) | -Etalon Bovine Serum Albumin (BSA) à 5 µg/µl (Pierce) |
| -Solution de Bradford diluée 5 fois (BioRad) | |
| -Eau distillée MilliQ (MilliPore) | -Lecteur de plaques 24 puits (Ultramark, BioRad) |

3.2.2 Méthode

Dans chaque tube, 1 ml de solution de Bradford diluée est ajouté, ensuite, de minute en minute, 2,5 µl d'eau, 2,5 µl d'étalon BSA, 2 µl de RE/SA et 2 µl de chaque échantillon sont ajoutés à leur tour. Après 5 minutes de réaction, l'absorbance est lue à 595 nm de minute en minute. La quantité de protéines de chaque échantillon est donc obtenue en référence à l'absorbance de l'étalon.

3.3 Dosage colorimétrique en plaques multi-puits de l'activation de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription par la méthode du Trans-AM®

Il est possible, pour certains facteurs de transcription, de détecter leur activation en suivant leur activité de liaison à l'ADN. C'est le cas de NF- κ B (voir Introduction).

Plusieurs méthodes sont utilisées afin de détecter la liaison à l'ADN des facteurs de transcription, dont le test de retard sur gel. Dans le cadre de ce mémoire, nous utiliserons le test Trans-AM® (Renard et al. 2001). Il s'agit en fait d'un test colorimétrique basé sur le principe du test ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), sauf que la protéine n'est pas liée par un anticorps fixé au fond du puits, mais bien par un oligonucléotide trappeur d'ADN double-brin contenant plusieurs séquences consensus de liaison à l'ADN de ce facteur de transcription. Le principe est décrit à la figure II.5. La liaison du facteur de transcription est estimée par mesure de l'absorbance à 405 nm.

Cette méthode présente de nombreux avantages : rapidité, absence de radioéléments, analyse possible pour beaucoup d'échantillons en une seule manipulation et haute sensibilité.

3.3.1 Matériels

- Cadre en plastique (Nunc)
- Strips de 8 puits avec séquences consensus de NF- κ B (5' -AGTTGAGGGGACTTCCCAGGC 3')
- PBS₅₀ (tampon phosphate 10 mM, NaCl 50 mM pH 7,4)
- Pipette Multichannel (Titertek)
- Tampon de binding (**Tableau II.4**)
- Tampon de lyse (**Tableau II.4**)
- Micro-tubes (Sarstedt)
- DTT 2,5 mM (Sigma)
- Tween (Sigma)
- Gloria (Nestlé)
- Tétraméthylbenzidine (TMB) (BioSource)
- Solution Stop (BioSource)
- Agitateur Innova 2000 (New Brunswick Scientific)
- Lecteur de plaques 24 puits (Ultramark, BioRad)
- Protease inhibitor cocktail PIC (Roche)
- Anticorps Anti p50 de lapin H119, (Santa Cruz # 7178)
- Anticorps Anti p65 de lapin C 20, (Santa Cruz # 372)
- Anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase de Raifort (HRP) (Santa Cruz #2054)

3.3.2 Méthode

5 μ g d'échantillons, dilués 400 x dans un volume final de 20 μ l dans du tampon de lyse complet, sont placés dans les puits au fond desquels sont fixés des séquences d'ADN consensus pour la liaison de NF- κ B, ainsi que 30 μ l de tampon de binding assurant la liaison de la protéine à l'ADN. Le temps de fixation des facteurs de transcription est fixé à une heure sur agitateur (100 rpm) à RT°. Ensuite, 3 lavages sont effectués au PBS₅₀ + Tween 0,1 % afin d'éliminer toutes les liaisons non spécifiques à l'ADN. L'anticorps primaire, reconnaissant la protéine d'intérêt, est dilué 1000 x dans du PBS₅₀ + Gloria 1 %, et 100 μ l de cette dilution sont distribués par puits. Le Gloria permet de bloquer tous les sites non spécifiques de l'anticorps et des protéines. L'anticorps est incubé dans les puits à RT° pendant 1 h. Chaque puits est ensuite lavé 3 fois au PBS₅₀ + Tween 0,1 % afin d'éliminer l'excès d'anticorps. 100 μ l d'anticorps secondaire dirigé contre la partie Fc de l'anticorps primaire et couplé à la HRP, dilué 1000 x dans du PBS₅₀ + Gloria 1 %, sont ensuite ajoutés à chaque puits. On laisse l'anticorps se fixer pendant une heure à RT°. Enfin, les puits sont lavés 4 fois au PBS₅₀ + Tween 0,1 %. Le substrat de la HRP (TMB) est ajouté dans tous les puits : le temps de réaction est de 10 minutes, à l'abri de la lumière. La réaction est arrêtée par l'ajout d'un acide puissant (la solution stop). La solution devient alors jaune, et l'absorbance peut être lue à 405 nm.

4 Évaluation de l'activité transactivatrice d'un facteur de transcription par système rapporteur

Il arrive qu'un facteur de transcription se fixe sur l'ADN mais n'exerce pas pour autant son action de recrutement de la machinerie de transcription. Il est donc nécessaire de trouver un moyen d'explorer ce niveau d'activité. A ces fins, un protocole de transfection des RAW 264.7 a été mis au point. Il nous est donc possible de suivre l'activation d'un facteur de transcription tel que NF- κ B après transfection avec un plasmide portant un gène rapporteur (luciférase ou β -galactosidase) sous le contrôle d'un promoteur synthétique contenant plusieurs sites de liaison de cette protéine (**Figures II.6**). L'activité de ces enzymes est ensuite mesurée en luminométrie ou en colorimétrie.

4.1 Matériels

- Plasmide pCMV- β Gal et pNF- κ B-Luc (Clontech)
- FuGène 6 (Roche)
- Superfect (Qiagen)
- Lipofectine (Invitrogen)
- Lipofectamine (Invitrogen)
- Milieu Optimem (Gibco)
- Plaques 12 puits (Costar)
- Milieu de culture pour RAW 264.7, avec ou sans sérum (**Tableau II.1**)
- Glo Lysis Buffer (Promega)

- Solution β -Gal: Tampon phosphate 0,5 M pH 7,4) 200 mM, MgCl₂ 2mM (Merck), ONPG 1,33 mg/ml (Acros organics), β -mercaptoéthanol 100 mM (Fluka)
- PBS
- Plaque 96 puits transparente (Nunc)
- Plaque 96 puits blanche (Nunc).
- Bright Glo, substrat luciférase (Promega)
- Lecteur de plaques 24 puits (Ultramark, BioRad)
- Lecteur de plaque en luminométrie (Luminoskan, Ascent)
- β -Gal Staining Set (Roche)

4.2 Méthode

Les mises au point de transfection sur les macrophages murins RAW 264.7 ont été réalisées avec le plasmide pCMV- β Gal (**Figure II.6a**) à une concentration d'ADN de 1 μ g dans 200 μ l en présence de différents agents transfectants : le FuGène 6, le Superfect, la lipofectamine 2000 et la lipofectine (**Tableau II.5**).

Avant toute expérience de transfection, les cellules sont repiquées la veille de la manipulation à la densité cellulaire voulue dans du milieu pour cellules RAW 264.7 à 10 % de sérum. Les temps d'incubation pour chaque agent transfectant sont résumés dans le tableau II.6.

Une fois les conditions de transfection optimales obtenues, des essais de doubles transfections en présence des plasmides pNF- κ B-Luc (**Figure II.6b**) ont été réalisées. De simples transfections en présence du plasmide pNF- κ B-Luc ont été effectuées, mais rapportées à la quantité de protéines, évaluées par un dosage à la méthode du Bradford.

4.2.1 Transfection à l'aide du FuGène6

Cet agent transfectant est composé principalement de lipides et d'autres composants non précisés dans la fiche technique.

Tout d'abord, le Fugène 6 est dilué dans de l'Optimem (3 ou 6 μ g/ μ l). Ensuite, l'ADN plasmidique (1 ou 2 μ g/ μ l) est ajouté au mélange « Optimem-Fugène ». Un volume de 50 μ l est prévu par puits. Pour les cellules transfectées dans un milieu sans sérum, les puits sont rincés une fois au PBS chaud. La transfection s'effectue ensuite dans 500 μ l de milieu chaud pour les cellules RAW 264.7, sans sérum (**Tableau II.6**). Enfin, les cellules sont rincées en présence de 1 ml de milieu sans sérum. Les cellules récupèrent une nuit dans du milieu à 10 % de sérum. Pour les temps d'incubation, se référer au tableau II.6.

4.2.2 Transfection à l'aide du Superfect

Ce polymère de transfection est un dendrimère activé (**Figures II.7**).

Contrairement au FuGène 6, l'ADN plasmidique est ici ajouté en premier lieu dans l'Optimem (**Tableau II.6**). De plus, le volume de complexe « ADN - Superfect » est ici complété par un volume de milieu pour RAW 264.7, avec ou sans sérum, afin d'arriver à un volume de 475 μ l par puits. Tous les puits sont rincés une fois au PBS chaud, décantés, puis 475 μ l de complexes sont ajoutés par puits. Les cellules sont incubées pendant 3 heures en présence des polyplexes, avant de remplacer le milieu par du milieu complet.

4.2.3 Transfection à l'aide de la lipofectine

La lipofectine est un agent de transfection formant des liposomes, composé d'un lipide cationique (le DOTMA : N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-n,n,n-triméthylammonium chloride) et d'un lipide neutre stabilisant, le dioléoyl phosphotidyléthanolamine (DOPE).

La première étape de transfection à la lipofectine est la dilution d'1 μ l d'ADN plasmidique (1 μ g/ μ l) dans 100 μ l d'Optimem. La lipofectine est diluée dans le milieu Optimem, à une concentration de 2 à 6 μ g par 100 μ l de milieu. Les mélanges « ADN - Optimem » et « lipofectine - Optimem » sont ensuite assemblés. Ensuite, 400 μ l par puits de milieu de culture sont ajoutés dans le mélange de transfection. Les cellules à transfecter sont toutes rincées une fois au PBS chaud. Enfin, 600 μ l du mélange de complexes sont ajoutés par puits. A la fin de l'incorporation des complexes, les cellules sont rincées une fois en présence d'un ml de milieu de culture sans sérum. Enfin, les cellules récupèrent toute la nuit dans 1 ml de milieu à 5 % de sérum (**Tableau II.6**).

4.2.4 Transfection à l'aide de la lipofectamine 2000

L'ADN plasmidique, à une concentration de 1 μ g/ μ l, est dilué dans 100 μ l de milieu Optimem. De même, l'agent transfectant est aussi dilué (à concentration variable en fonction des rapports testés) dans 100 μ l de milieu Optimem. Après 5 minutes de repos des mélanges « ADN - Optimem » et « Lipofectamine - Optimem », ces 2 mélanges sont réunis. Lors d'un test de transfection en l'absence de sérum dans le milieu de culture, les cellules sont rincées une fois au PBS chaud, 1 ml de milieu sans sérum est ensuite ajouté. Une fois les complexes formés, 200 μ l de complexes par puits sont prévus. Le milieu contenant les complexes de transfection est remplacé par 1 ml de milieu à 5 % de sérum (**tableau II.6**).

4.2.5 Révélation de l'activité β -galactosidase

Les cellules transfectées sont rincées 2 fois en présence d'un ml de PBS à RT°. Après décantation de la solution de rinçage, 200 μ l de Glo Lysis Buffer sont ajoutés par puits. La lyse des cellules se produit en 5 minutes à RT°. Le lysat cellulaire est alors transféré dans un microtube. Ensuite, 75 μ l de lysat sont déposés dans les puits de la plaque 96 puits. Un volume égal de substrat pour la β -galactosidase est alors additionné à chacun de ces puits. L'absorbance des échantillons est lue à 405 nm, après 30 minutes d'incubation à 37°C.

Pour un marquage histochimique de l'activité β -Galactosidase, les cellules transfectées rincées 2 fois au PBS sont ensuite fixées 5 minutes en présence d'une solution de formaldéhyde 2 % et de 0,2 % de glutaraldéhyde, dilué dans le PBS. Après fixation, les cellules sont rincées 3 fois au PBS. Le substrat X - Gal est ensuite ajouté et les cellules sont

incubées 30 minutes à 37°C. Les micrographies sont prises au microscope à contraste de phase après 3 rinçage au PBS.

4.2.6 Révélation de l'activité luciférase

La lyse des cellules pour la révélation de l'activité luciférase s'effectue de la même manière, mais la lecture du signal de bioluminescence émis par lysat cellulaire (100 µl) est réalisée juste après ajout du substrat de la luciférase (100 µl).

Dans le cas d'un dosage de protéines de cellules transfectées, 10 µl d'échantillons sont ajoutés à chaque réactif de Bradford (voir point 3.2).

5 Analyse comparative des profils d'expression génique

Ces analyses permettent de comparer l'expression génique au niveau ARN messagers (ARNm), dans un type cellulaire, soumis à des conditions particulières de stimulation. A partir d'ARN provenant des échantillons, nous allons tout d'abord vérifier l'intégrité de ces ARNs, afin d'être certain que les ARNs d'intérêts ne sont pas dégradés. Ensuite, une rétro-transcription nous permettra d'obtenir les échantillons d'ADN complémentaires (ADNc) que nous hybriderons sur un damier à ADN (Figure II.8).

5.1 Extraction d'ARN total

Les cellules sont raclées dans une solution dénaturante composée de thiocyanate de guanidine, et d'un mélange de citrate, sarcosine, et β-mercaptoéthanol. Le thiocyanate de guanidine et le β-mercaptoéthanol inactivent rapidement les RNases endogènes, alors que la sarcosine permet de dénaturer les complexes ribonucléoprotéiques. Le pH de la solution est maintenu à 7 par l'ajout d'acétate de sodium. La séparation de l'ARN des protéines et de l'ADN s'effectue lors de l'ajout dans l'échantillon d'une solution de Phenol / Chloroform / Isoamyl alcohol. Afin de concentrer l'ARN extrait, un volume égal d'isopropanol est additionné à notre solution. Il sera finalement lavé à l'éthanol et conservé à -80° C dans de l'eau RNase Free.

5.1.1 Matériels

- | | |
|-----------------------------------|---|
| -SDS 1% (Merck) | -Micro-tubes (Sarstedt) |
| -Gants (Mölnlycke Health Care AB) | -Kit RNAgents® Total RNA Isolation System (Promega) |
| -Pipette stérile (Sarstedt) | -Ethanol 75% (Merck) |
| -Rateau de 24 cm stérile (TPP) | -Centrifugeuse pour micro-tubes à 4°C (Eppendorf) |
| -Spectrophotomètre (Ultrospect) | |

5.1.2 Méthode

Nous nettoyons dans un premier temps tout le matériel utilisé au SDS 1% afin de dénaturer toutes les RNases exogènes. La solution dénaturante est déposée sur glace et le mélange Phenol / Chloroform / Isoamyl alcohol est mis à RT° 15 minutes avant de commencer l'extraction d'ARN.

Le milieu des boîtes de culture est décanté, et les cellules sont ensuite rincées une fois en présence de 5 ml de PBS stérile à 4°C. Après rinçage et décantation du PBS, 300 µl de solution dénaturante sont ajoutés – 120 µl par million de cellules. Les cellules sont raclées dans cette solution et le lysat est transféré dans un micro-tube RNase Free. L'acétate de

sodium (30 µl, un dixième du volume de la solution dénaturante) est ici additionné au lysat. Après quelques inversions, 300 µl Phenol / Chloroform / Isoamyl alcohol sont ajoutés à chaque tube. La solution est ici vigoureusement mélangée, et vortexée pendant 10 secondes. La solution blanchâtre résultante est incubée pendant 15 minutes sur glace. Après une centrifugation de 20 minutes à 10.000 \times g, trois phases se distinguent dans le mélange :

- Une phase aqueuse supérieure, contenant l'ARN.
- Une « galette » blanche au centre, retenant à l'interface l'ADN génomique et une partie des débris cellulaires.
- La phase inférieure organique, contenant les protéines.

Délicatement, la phase aqueuse est prélevée et transférée dans un nouveau micro-tube, sans toucher l'interface, ce qui serait source de contamination au thiocyanate de guanidine. Un volume égal d'isopropanol est additionné aux ARNs, puis l'échantillon est congelé pendant au moins 30 minutes à -20°C. Après une nouvelle centrifugation de 10 minutes à 10.000 \times g, le surnageant est éliminé et le culot d'ARN est lavé dans 1 ml d'éthanol 75 % à 4°C. Un nouveau passage à la centrifugeuse 10 minutes à 10.000 \times g permet d'éliminer la majeure partie de l'éthanol. L'échantillon est ensuite séché à l'air libre. L'ARN resuspendu dans 20 µl d'eau RNase Free et conservé à -80°C. Afin de connaître la concentration en ARN et la proportion de contaminants dans l'échantillon, une analyse au spectrophotomètre est réalisée à 260 nm (absorbance des acides nucléiques), 280 nm (absorbance des protéines) et 230 nm (absorbance de l'isothiocyanate).

5.2 Analyse de l'intégrité de l'ARN au Bioanalyzer

Le BioAnalyzer d'Agilent est un appareil permettant d'évaluer l'intégrité de l'ARN extrait, après migration électrophorétique des ARNs. Une sonde fluorescente spécifique de l'ARN simple brin est introduite dans les échantillons, ce qui permet leur détection, lorsqu'ils passent devant un laser. La quantité d'ARN détecté est donnée par mesure de l'aire en-dessous de la courbe (**Figure II.9**). L'intégrité de l'ARN est estimée par l'allure de l'électrophérogramme obtenu. En effet, la migration électrophorétique permet de détecter 2 pics principaux d'ARN total, l'ARN 18 S et l'ARN 28 S. Le profil d'apparition des ces 2 pics permet d'évaluer la dégradation de l'ARN. Pour un échantillon d'ARN intact, les 2 pics d'ARN 18 S et 28 S sont bien définis, et la quantité d'ARN 28 S est 2 fois plus importante que la quantité d'ARN 18 S. Une faible dégradation des produits d'extraction peut être constatée lorsque la quantité d'ARN 28 S diminue. Enfin, on estime que l'ARN est de faible qualité lorsque la ligne de base augmente et devient sinueuse, et que le rapport ARN 18S/ARN 28S descend en dessous de 1,8. Si les profils d'ARN obtenus présentent un aspect dégradé, il est déconseillé d'utiliser cet ARN en vue d'une hybridation sur damier à ADN.

5.3 Rétro-transcription en vue d'une hybridation

Lors de cette étape, des brins d'ADNc sont formés à partir d'ARN messagers (ARNm). La l'initiation de la rétro-transcription se fait par hybridation sur les queues poly-A d'amorces polyT, ce qui constitue un site de démarrage pour la transcriptase inverse.

5.3.1 Matériels

- | | |
|---|--|
| -Micro-tubes de 1,5 ml (Sarstedt). | -biotin-11-dCTP 1 mM (Perkin-Elmer) |
| -Oligo (dT) ₍₁₂₋₁₈₎ Primer (0,5 µg/µl) (Invitrogen) | -RNasin Ribonuclease inhibitor (40 U/µl) (Promega) |
| -Eau « RNase-Free » (Promega) | -dNTP mix (Roche) |
| -Superscript II RNase H- (200 U/µl) avec Buffer RT 5X et DTT 0,1 M (Invitrogen) | -Internal Standard mix (Eppendorf) |
| -RNase H (Invitrogen) | -Gants (Mölnlycke Health Care AB) |

5.3.2 Méthode

Tout d'abord, 10 µg d'ARN, dans un volume maximal de 5,5 µl sont prélevés dans chaque échantillon. Si les échantillons ne sont pas assez concentrés, une étape préalable de lyophilisation est réalisée. L'échantillon d'ARN est complété de différents éléments dont :

- 2 µl de standard interne : il s'agit d'un mélange de 6 ARN, rétro-transcrits comme les échantillons et qui trouvent dans le damier un brin auquel ils pourront s'hybrider.
- 2 µl d'oligo(dT): ce sont les amorces qui s'hybrideront aux queues poly-A des ARNm.
- de l'eau RNase-free, afin d'arriver à un volume de 9,5 µl.

Une fois ces mélanges effectués pour les différents échantillons, la température des échantillons est portée à 70°C pendant 10 minutes, afin de s'assurer que tous les brins sont dénaturés, qu'ils ne forment plus de structures secondaires. La réaction est arrêtée par un passage sur glace pendant 5 minutes. 9 µl de mix de réaction sont ensuite additionnés (**Tableau II.7**). 1,5 µl de transcriptase inverse, la Superscript II, sont ajoutés à l'échantillon, qui est incubé 1h 30 à 42°C. Cette étape est répétée une deuxième fois, afin d'optimiser la transcription inverse. Après ces 2 cycles de transcription inverse, 1 µl d'une enzyme, la RNase H, dégradant spécifiquement l'ARN lié à l'ADNc, est ajouté à la solution. Un passage final de 3 minutes à 95°C est effectué afin de dénaturer toutes les molécules d'ADN simple-brin. Ensuite, les ADNc obtenus sont conservés à -20°C.

5.4 Hybridation d'ADNc sur un damier à ADN en vue de déterminer des profils d'expression génique

L'hybridation d'ADNc sur damier à ADN à basse densité constitue une démarche sans *a priori*, semi-quantitative, de l'analyse de l'expression génique. Dans le cadre de ce mémoire, les « DualChip® Mouse Inflammation » ont été utilisées sur les échantillons d'ADNc de cellules murines (RAW 264.7). Ce damier à ADN a été conçu afin d'avoir une vue d'ensemble générale des profils d'expression génique des cellules subissant une agression inflammatoire. Une liste brève des principaux gènes représentés sur la DualChip® Mouse Inflammation est donnée au tableau II.8. Le design du damier Mouse Inflammation est donné à la figure II.10.

5.4.1 Matériels.

-Kit DualChip® Inflammation (Eppendorf), contenant:

- DualChip® Mouse Inflammation (Eppendorf)
- Hybridization Buffer A
- Hybridization Buffer B
- Biotin Hyb Control
- Eau RNase-Free (5prime)
- UniBuffer 250 ml (5prime)
- Blocking reagent (Skim Milk, Difco)
- Produit de rétro-transcription
- H₂O MilliQ (MilliPore)

- Tween 20 (Sigma)
- Anticorps anti-biotine-cy3 (Lucron Bioproduct)
- Feuilles d'aluminium autocollant (Eppendorf)
- Thermomixer (Eppendorf)
- Four (Techne Hybridiser HB-1x, Thermo IEC)
- Baquet en verre pour les rinçages (Sigma)
- Centrifugeuse CL3R (Centro)
- Scanner confocal à fluorescence (Scan Array express, Packard Bioscience Chips technologies)
- Statistical Software (Eppendorf)
- ImaGene 5.5 (Biodiscovery)

5.4.2 Méthode

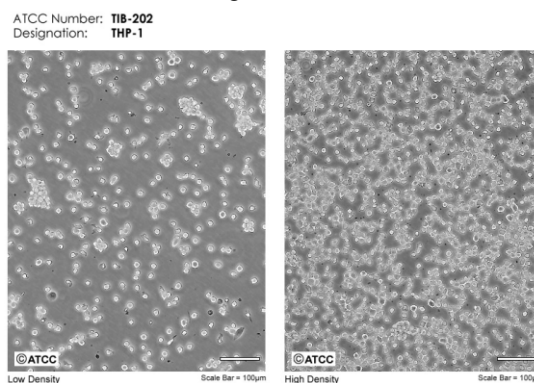
Premièrement, les échantillons de transcription inverse sont dilués dans la solution décrite dans le tableau II.9. Le mélange est resuspendu, puis introduit délicatement dans la chambre d'hybridation. Après nettoyage des orifices d'injection, les damiers sont recouverts d'un film autocollant d'aluminium. Les lames sont alors déposées dans le thermoblock. L'incubation se

déroule toute la nuit, à 60°C, à 1.400 rpm. Le lendemain, les chambres en silicone bordant les damiers sont retirées. Les lavages peuvent alors débuter : les 2 premiers lavages s'effectuent 2 minutes à l'Unibuffer 0,1x Tween 20 0,1 %. Après ces lavages, la fixation de l'anticorps anti-biotine est réalisée : les lames sont placées sur 800 µl de la dilution 1000x de l'anticorps déposée sur un film transparent. 45 minutes d'incubation à l'abri de la lumière sont respectées. Après cette étape, l'excès d'anticorps est éliminé par 5 lavages de 2 minutes au tampon Unibuffer 0,1x Tween 20 0,1%, ensuite, 2 fois 2 minutes à l'eau distillée. Les lavages terminés, les lames peuvent être séchées par centrifugation 5 minutes à 600 rpm. Enfin, les lames sont prêtes à être scannées, à trois gains (100, 70 et 50) au scanner confocal à fluorescence. Ces images sous format TIFF sont quantifiées grâce au programme Imagene 5.5. Les analyses de ces résultats s'effectuent ensuite grâce à l'interface informatique, le Statistical Software. Il va tout d'abord effectuer une analyse des contrôles d'hybridations négatifs. Ensuite, ce programme va effectuer plusieurs normalisations des données, d'une part en prenant en référence les standards internes, d'autre part en normalisant les résultats par rapport aux valeurs des gènes de maintenance (HKG, pour « House-Keeping Genes »). Lors de la première analyse, tous les « house-keeping » genes sont gardés. Plus tard, une analyse approfondie de ces gènes va être réalisée, afin de ne conserver que ceux dont l'expression varie le moins dans les conditions expérimentales déterminées. Enfin, un récapitulatif des différents ratios de ces valeurs est exécuté. C'est à partir de ce récapitulatif que nous pourrons étudier les profils d'induction ou de répression génique.

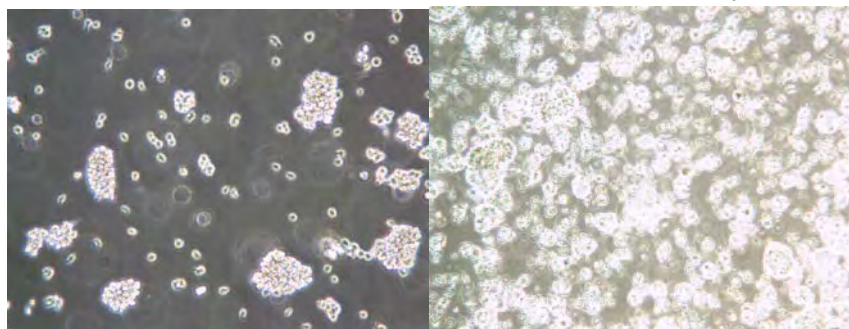
Monocytes THP-1	Macrophages RAW 264.7
Milieu de culture RPMI 1640 + L-Glutamine (Gibco BRL-500 ml)	Milieu de culture Dulbeco's Modified Eagle's Medium- High Glucose 4,5 g/l
Hepes 10 mM (Acros Organics)	NaHCO ₃ 1,5 g/l (Gibco-Invitrogen)
Na Pyruvate 1 mM (Sigma)	Sérum de veau foetal 10 % décomplémenté (Gibco)
β-Mercaptoéthanol 0,05 mM (Sigma)	
Glucose 4,5 g/l (Merck)	
Sérum de veau foetal décomplémenté 10 % (Gibco)	

Tableau II.1: Composition des milieux de culture pour macrophages murins RAW 264.7 et cellules monocytaires THP-1.

Figure II.1 :



A.



B.

a. Photographie en microscopie à contraste de phase de monocytes THP-1 à faible densité (gauche) et à confluence (droite).

<http://www.lgcpromochem-atcc.com/>

b. Photographie en microscopie à contraste de phase de monocytes THP-1 cultivés au laboratoire.

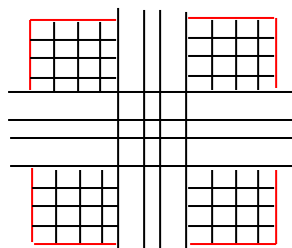
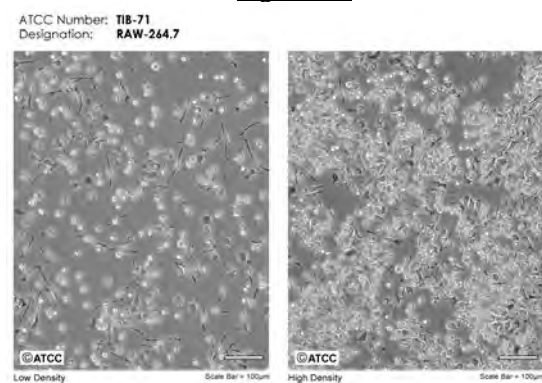


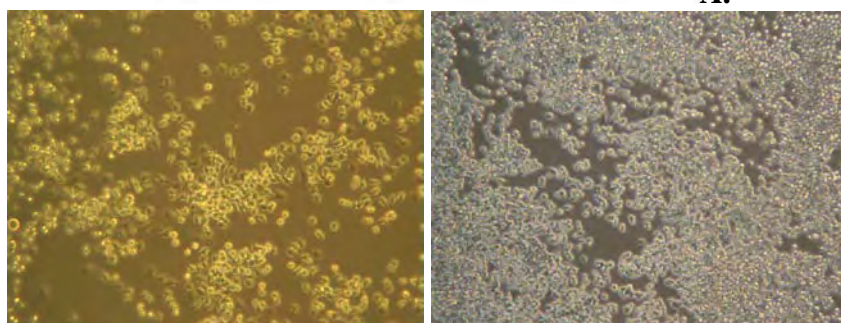
Figure II.2 : Schéma d'une cellule de Neubauer. C'est une plaque de verre gravée de 8 grands carrés microscopiques, délimitant des zones régulières de comptage. Les cellules se trouvant sur les lignes extérieures (en rouge) ne seront pas comptées. Le nombre de cellules comptées est multiplié par 2 (suspension cellulaire est diluée 2 fois) et par 10.000 (facteur volumétrique).

Nombre (nb) de cellule par ml=
$$\frac{\text{nb de cellules comptées} \times 2 \times 10.000}{\text{nb de grands carrés comptés}}$$

Figure II.3



A.



B.

a : Photographies en microscopie à contraste de phase de macrophages murins RAW 264.7 à faible densité (gauche) et à confluence (droite).

<http://www.lgcpromochem-atcc.com/>

b : Photographies en microscopie à contraste de phase de macrophages murins RAW 264.7 cultivés au laboratoire.

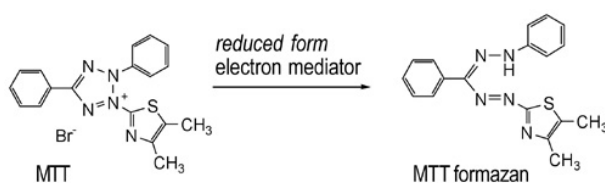


Figure II.4 : Structure chimique du MTT, et réaction de réduction du MTT en formazan.

<http://www.dojindo.com/>

Solution de lyse utilisée pour le test MTT
2 volumes de SDS 30 %
1 volume N, N diméthylformamide
par l'ajout d'une solution d'acide acétique/HCl 9 :1pH 4,7

Tableau II.2: Composition de la solution de lyse utilisée dans la méthode au MTT.

Hypotonic Buffer 2 x	Hepes 20 mM (Acros Organics) ; NaF 5 mM (Merck), Na ₂ MoO ₄ 1 mM (sigma), EDTA 0,1 mM (Merck)
Tampon RE (pour 1 ml)	500 µl d'HB 2x, 200 µl de glycérol (Merck), 300 µl d' H ₂ O MilliQ
Tampon SA (pour 1 ml)	500 µl d' HB 2x, 200 µl de glycérol (Merck), 200 µl de NaCl 4 M (Merck), 100 µl d'H ₂ O

Tableau II.3: Composition des tampons utilisés lors de l'extraction de protéines nucléaires

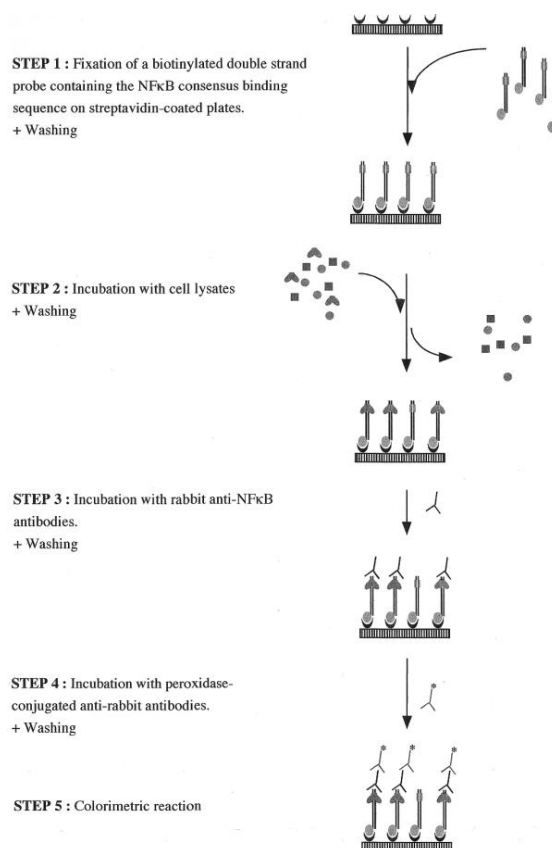


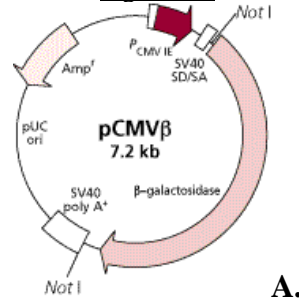
Figure II.5: Représentation schématique du déroulement du dosage colorimétrique pour mesurer l'activité de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription. (Renard et al., 2001)

Ce test, basé sur le principe ELISA, implique la liaison au fond du puits de trappeur d'ADN contenant la séquence consensus de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription. Afin d'identifier la protéine liée au trappeur, un anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt sera ensuite ajouté. La visualisation en colorimétrie est assurée par l'ajout d'un anticorps secondaire dirigé contre le fragment Fc de l'anticorps primaire couplé à la peroxydase de raifort (ou Horse Radish Peroxidase ou HRP), dont le substrat, la tétraméthylbenzidine, oxydée par la HRP, se colore en jaune

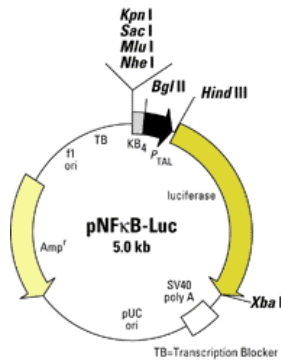
Tampon de binding	Hepes 4 mM (Acros Organics), KCl 100mM (Merck), Glycérol 8 % (Merck), DTT 5 mM, 0,2 % BSA (PAA), 0,016 % DNA Salmon Sperm-pH 7,5
Tampon de lyse	Hepes 20 mM (Acros Organics), NaCl 35 mM (Merck), MgCl ₂ 1 mM (Merck), EDTA 0,5 mM (Merck), EGTA 0,1 mM (Merck), Glycérol 20 % (Merck), NP-40 1 % (Sigma), pH 7,5

Tableau II.4 : Composition des tampons utilisés lors du test Trans-AM®.

Figure II.6



A.



B.

a : Représentation schématique du plasmide pCMV-βGalactosidase de Clontech

b : Représentation schématique du plasmide pNF-κB portant le gène rapporteur luciférase (Clontech).

	Avec sérum						Sans sérum					
	150.000 cellules /puits			250.000 cellules/puits			150.000 cellules /puits			250.000 cellules/puits		
FuGène 6	1 : 3	2 : 3	1 : 6	1 : 3	2 : 3	1 : 6	1 : 3	2 : 3	1 : 6	1 : 3	2 : 3	1 : 6
Superfect	1 : 2	1 : 4	1 : 6	1 : 2	1 : 4	1 : 6	1 : 2	1 : 4	1 : 6	1 : 2	1 : 4	1 : 6
Lipofectine	1 : 2	1 : 4	1 : 6	1 : 2	1 : 4	1 : 6	1 : 2	1 : 4	1 : 6	1 : 2	1 : 4	1 : 6
Lipofectamine 2000	1 : 1	1 : 2	1 : 4	1 : 1	1 : 2	1 : 4	1 : 1	1 : 2	1 : 4	1 : 1	1 : 2	1 : 4

Tableau II.5 : Conditions testées dans les mises au point de transfection.

Les rapports cités correspondent aux rapports « ADN - agent transfectant » testés dans chaque condition.

Pour chaque transfection, nous avons utilisé 1 µg d'ADN plasmidique.

	ADN	Agent	Formation des complexes	Incubation cellules-complexes
Fugène 6	2° : 15 min	1° : 5 min (Fugène6 + Optimem)		3h
Superfect	1° : 5 min (ADN + Optimem)	2° 15 min		3h
Lipofectine	ADN + Optimem: 30 min	Lipofectine + Optimem: 30 min	10 min	5h
Lipofectamine	ADN + Optimem: 5 min	Lipofectamine+ Optimem: 5 min	20 min	5h

Tableau II.6 : Récapitulatif des temps d'incubation pour les différents agents transfectant.

Colonne 2 : Temps d'incubation de l'ADN dilué dans l'Optimem

Colonne 3 : Temps d'incubation de l'agent transfectant dans l'Optimem.



Figure II.7: Représentation d'un dendrimère de Superfect®.
www1.qiagen.com

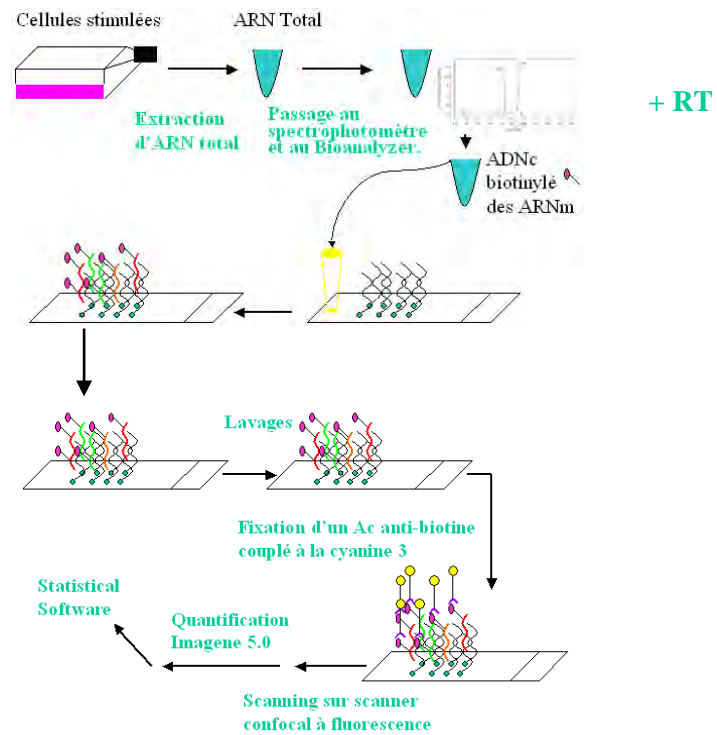


Figure II.8 : Schéma de la procédure d'hybridation et d'analyse d'une DualChip®.

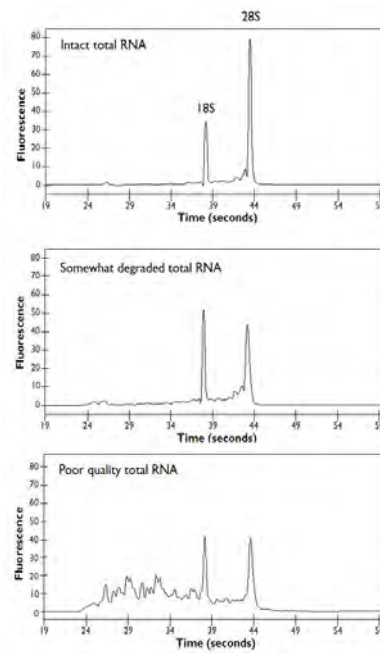


Figure II.9 : Electrophérogramme d'extrait d'ARN total passé au BioAnalyzer d'Agilent. L'électrophérogramme du dessus est celui d'un extrait d'ARN non dégradé, l'extrait correspondant au deuxième graphe est partiellement dégradé. L'ARN du troisième graphe est fortement dégradé.

www.ym.edu.tw

-Buffer RT 5x : 4 µl
-DTT 0,1 M : 2 µl
-RNasin : 1 µl
-Mix de dNTP, dont les dCTP biotinylé : 2 µl. dTTP 5 mM, dATP 5 mM, dGTP 5 mM, dCTP biotinylé 800 µM
Au total : 9 µl /échantillon

Tableau II.7 : Mix de réaction ajouté lors de la transcription inverse.

Classes de gènes	Exemples de protéines encodées
Gènes impliqués dans la réponse aux pathogènes	-Toll-Like Receptors
Gènes codant pour des cytokines et les récepteurs associés	-Interleukines -TNF -GM-CSF -TGF- β
Gènes intervenant dans le processus d'adhérence leucocytaire	-Sélectines -Chémokines -ICAM-1 -VCAM-1 -Métallo-protéases (MMP-9)
Gènes encodant des marqueurs de l'inflammation	-C-Reactive Protein -Certains phospholipases A ₂ -Cyclooxygénase 2 -NO synthase inductible -Fragment C3 du complément.
Gènes impliqués dans les voies de transduction du signal impliquées dans le signalling au LPS.	-MAPKS -membre de la famille des protéines impliquées dans la voie de la PI3K-Akt -NF- κ B -PPARs
Gènes codant pour des protéines impliquées dans l'apoptose.	-Bad -Bcl-2

Tableau II.8 : Quelques gènes représentés sur la DualChip® Mouse Inflammation, parmi les 233 gènes représentés au total.

Hybridization Buffer A	10 μ l
Hybridization Buffer B	40 μ l
Produit de RT	20 μ l
Biotin Hybridization control	10 μ l
H ₂ O RNase Free	20 μ l
Volume final	100 μ l

Tableau II.9: Ensemble des réactifs à ajouter aux produits de RT pour l'hybridation sur DualChip®.

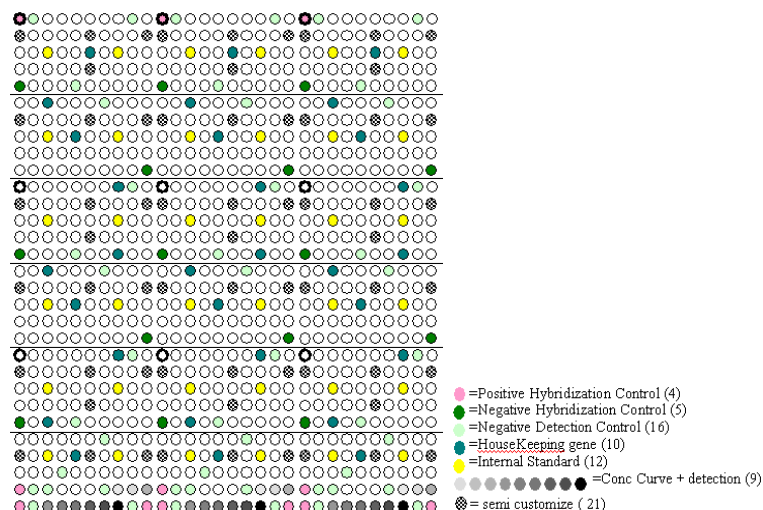


Figure II.10 : Contrôles se trouvant sur la DualChip® Mouse Inflammation.

Le bon fonctionnement du damier à ADN nécessite la présence de toute une série de contrôle de détection d'hybridations négatifs et positifs, des standards internes, et une série de « house-keeping » genes, c'est-à-dire des gènes dont on suppose que l'expression ne varie pas lors du traitement subi par les cellules. De plus, des contrôles de détection positifs et négatifs se trouvent sur le damier à ADN.

3. Résultats et discussion

Résultats et discussion

Dans ce travail, nous avons étudié d'une part l'influence de molécules exogènes, à propriétés potentiellement anti-inflammatoires (cardénolides d'Unibioscreen) sur l'état d'activation du facteur de transcription NF- κ B, et d'autre part, nous avons réalisé un travail préliminaire dans le cadre d'une recherche visant à éclaircir les contributions respectives des voies NF- κ B, PI3K et mTOR dans la réponse inflammatoire de monocytes/macrophages murins stimulés au LPS.

1 Etude de la réponse inflammatoire, induite par le LPS, de cellules monocytaires humaines en présence ou non de molécules à activité potentiellement anti-inflammatoire : les cardénolides (Collaboration avec la firme Unibioscreen)

1.1 Modèle cellulaire

Nous avons utilisé les cellules THP-1 sous deux formes, d'une part des monocytes en suspension, et d'autre part des macrophages différenciés avec le Phorbol Myristate Acétate (PMA) (voir Matériels et Méthodes, Culture des monocytes THP-1). Après 24 h d'incubation en présence de PMA, ces cellules deviennent adhérentes au fond de la boîte de culture, et se comportent comme des macrophages (**Figure III.1**). Par exemple, Sofia Dos Santos, dans le cadre de sa thèse a confirmé la présence de récepteurs « scavengers » : les THP1 différenciés en macrophages avec le PMA, lorsqu'ils sont incubés avec des LDL oxydées, les internalisent et se transforment *in vitro* en cellules spumeuses, ce qui les différencie des monocytes THP-1.

D'autres marqueurs de la différenciation des monocytes en macrophages peuvent être utilisés : l'expression en membrane des molécules mCD14 augmente lors de la différenciation; par contre l'expression et l'affinité du récepteur CCR2, récepteur à la chémokine MCP-1, diminuent après différenciation en présence d'ester de phorbol (Denholm and Stankus 1995).

Nous avons choisi un modèle cellulaire humain, car les études préliminaires testant les propriétés des cardénolides sur des cellules murines ont montré que ces dernières ne répondent pas à la stimulation en présence de ces molécules exogènes (données communiquées par Unibioscreen).

Les premières études portant sur les cardénolides, ont été effectuées sur des cellules A549 (cellules épithéliales humaines de carcinome de poumon) (Mijatovic et al. 2006). La firme Unibioscreen souhaitait analyser, dans un deuxième temps, les effets de leurs nouveaux composés à l'aide d'un outil puissant disponible à l'U.R.B.C.: la DualChip® Human Inflammation, afin d'étudier l'effet d'une stimulation de monocytes/macrophages en présence de cardénolides sur les profils d'expression génique. Pour rappel, ce damier permet de suivre l'expression de 310 gènes, impliqués de près ou de loin dans les processus d'inflammation.

1.2 Détermination de la cytotoxicité des cardénolides sur les THP-1

Unibioscreen avait déjà réalisé un test préalable de cytotoxicité des cardénolides sur les monocytes THP-1, à l'aide d'un test MTT en plaque 96 puits. En revanche, ces tests ont été effectués sur des cellules cultivées dans un milieu à 10 % de sérum. Or, dans notre modèle, nous stimulons les cellules dans un milieu de culture à 1 % de sérum, conditions de culture

rendant les cellules beaucoup plus sensibles vis-à-vis d'un stress. C'est pourquoi de nouvelles évaluations de la cytotoxicité des cardénolides sur les THP-1 ont été réalisées.

Différentes concentrations de ces molécules ont été choisies à partir des résultats des tests précédents et 3 concentrations différentes ont été étudiées en UBS 1450 (0,1 μ M, 0,5 μ M et 1 μ M), ainsi que deux concentrations en UBS 3529 et 3530 (1 et 10 μ M) sur le modèle de cellules monocytaires incubées 6 heures en présence de ces molécules (**Figure III.2**).

On observe bien que la cytotoxicité des cardénolides utilisés sur les THP-1 est faible. Seul l'UBS 1450 semble moins bien toléré, puisqu'il induit la mort cellulaire de plus ou moins 20 % de la population des monocytes.

En conséquence, nous avons choisi de garder les concentrations suivantes :

- 0,1, 0,5 et 1 μ M pour l'UBS 1450
- 1 et 10 μ M pour l'UBS 3529
- 1 et 10 μ M pour l'UBS 3530.

Ces concentrations seront retenues afin d'effectuer les expériences de mises au point sur les monocytes THP-1, permettant d'évaluer les activités constitutive et induite par le LPS du facteur NF- κ B, en présence ou non de cardénolides.

1.3 Mise au point du modèle de stimulation en présence des cardénolides

Avant d'entreprendre des analyses de profils d'expression génique, onéreuses et fastidieuses, il est indispensable de mettre au point un modèle expérimental pour tester les effets anti-NF- κ B des différents cardénolides. Cela nous permettra de déterminer précisément les conditions optimales de stimulation des monocytes/macrophages THP-1 avec le LPS, en présence ou non des cardénolides, afin de pouvoir observer et comparer des activités potentiellement anti-inflammatoires de ces molécules sur la voie de transduction du signal menant à l'activation de NF- κ B. L'inhibiteur de référence utilisé afin d'inhiber cette voie, est le BAY 11-7082 (voir point 2.2.2.1.d. de l'Introduction). A ces fins, nous avons utilisé une méthode bien moins coûteuse et beaucoup plus rapide, le test Trans-AM®, permettant d'évaluer la liaison du facteur de transcription à l'ADN.

1.3.1 Présentation des modèles d'études

Comme mentionné plus haut, les monocytes THP-1 peuvent être différenciés *in vitro* en macrophages par l'ajout de PMA dans le milieu de culture. Nous avons donc établi notre modèle sur cellules THP-1 en suspension (monocytes) et sur cellules adhérentes (macrophages) (**Figure III.3**)

Par ailleurs, nous étudierons et le niveau d'activation constitutif, en l'absence de toute stimulation, et le niveau d'activation de NF- κ B induit en présence de LPS, à une concentration de 100 ng/ml (Weinstein et al. 2000; Kim et al. 2005). Il nous a semblé indispensable d'étudier la réponse cellulaire dans ces deux cas, car Unibioscreen a déjà montré une activité anti-NF- κ B du cardénolide UBS 1450, mais cela sur l'activité constitutive de NF- κ B (Mijatovic et al. 2006).

L'inhibiteur de référence de la voie NF- κ B utilisé afin de comparer d'éventuels effets anti-NF- κ B des cardénolides, est le BAY 11-7082. Pour inhiber l'activité constitutive de NF- κ B, le BAY 11-7082 sera ajouté à une concentration de 25 μ M pendant 15 heures. L'activité induite de NF- κ B par le LPS, sera inhibée par incubation avec ce même inhibiteur pendant 30 minutes.

1.3.1.1 Stimulation des macrophages THP-1

Avant de tester les cardénolides sur les macrophages, il nous a fallu choisir le temps de stimulation de ces cellules en présence de LPS à une concentration de 100 ng/ml. Les temps de stimulation choisis sont de 20, 40 et 60 minutes en présence de 100 ng/ml (**Figure III.4**). L'activation de NF- κ B est évaluée à l'aide d'un test Trans-AM®, en utilisant des anticorps dirigés contre p50 et des anticorps dirigés contre p65

Tout d'abord, avec les anticorps anti-p50, nous remarquons une activité de liaison constitutive de NF- κ B dans les cellules non traitées au LPS. Ensuite, nous observons que, malgré une liaison à l'ADN élevée dans les cellules contrôle, le LPS augmente encore cette activité de liaison à l'ADN, avec un maximum à 40 minutes (1,7 fois).

Par contre, avec les anticorps anti-p65, nous remarquons une activité basale plus faible. Après stimulation au LPS, on observe une activation maximale de la liaison à l'ADN à 40 minutes de stimulation (6,4 fois). Nous n'observons plus d'augmentation à 60 minutes de stimulation.

En conclusion, nous avons décidé de stimuler les macrophages THP-1 en présence de LPS à 100 ng/ml pendant 40 minutes.

Une fois le temps de stimulation déterminé (40 minutes), nous allons tester un inhibiteur de référence, le BAY 11-7082. Nous effectuerons dès lors une étude d'une part de l'activation constitutive de NF- κ B et d'autre part de l'activité de NF- κ B induite par le LPS, en présence ou non du BAY 11-7082, afin de pouvoir comparer d'éventuels effets anti-NF- κ B des cardénolides à celui exercé par le BAY 11-7082. L'activation de NF- κ B est toujours évaluée via le test Trans-AM®.

a) Effet du BAY 11-7082 sur l'activation constitutive de NF- κ B dans des macrophages THP-1

Les cellules n'étant pas stimulées en présence de LPS, nous n'étudions que les dimères NF- κ B constitutivement actifs dans ces cellules (**Figure III. 5**).

Nous observons une diminution (1,3 fois) de la liaison à l'ADN avec l'anticorps anti-p50 lors du traitement des macrophages THP-1 en présence de BAY 11-7082 25 μ M pendant 15 heures.

Une diminution comparable de la liaison à l'ADN avec l'anticorps anti-p65 n'a pas pu être observée.

b) Effet du BAY 11-7082 sur l'activation induite de NF- κ B dans les macrophages THP-1

Nous avons testé ensuite les effets du BAY 11-7082 25 μ M sur les macrophages THP-1, différenciés avec le PMA, stimulés en présence de LPS.

Les cellules sont d'abord pré-incubées (30 minutes) avec le BAY 11-7082. Elles sont ensuite stimulées en présence de LPS à une concentration de 100 ng/ml pendant 40 minutes, temps déterminé précédemment.

Tout d'abord, nous observons, comme nous l'attendions, une augmentation de 1,6 fois de la liaison à l'ADN de NF- κ B par rapport au contrôle, avec l'anticorps anti-p50 (**Figure III.6**).

Cependant, nous n'observons pas de forte diminution de la liaison de NF- κ B en présence du BAY 11-7082, et cela avec les deux anticorps utilisés.

Les résultats obtenus avec le BAY 11-7082 sont donc décevants.

Discussion

Avant de tester les effets anti- NF- κ B potentiels des cardénolides, nous avons voulu mettre au point un test facile pour évaluer les effets anti-NF- κ B. Notre choix s'est porté sur le test Trans-AM®, qui permet de déterminer l'activité de liaison du facteur à l'ADN, que ce soit dans les cellules non stimulées (activité basale) ou stimulées (dans notre cas avec le LPS). Ce test est opérationnel, mais nous avons rencontré des problèmes avec le BAY 11-7082, inhibiteur bien décrit de NF- κ B dans la littérature et qui sur les macrophages THP-1, n'exerce que peu d'effets.

Une explication possible est que nous travaillons sur des cellules différenciées en présence de PMA. Certains auteurs soulignent une activation des protéines IKK via la voie des PKC atypiques, dont la PKC ζ (Vertegaal et al. 2000). Il n'est donc pas exclu que le PMA active le facteur NF- κ B, par des voies non classiques. On comprend dès lors que le BAY 11-7082 n'ait pas ou peu d'effets.

1.3.1.2 Stimulation des monocytes THP-1.

Nous avons donc fait les mêmes mises au point, mais sur monocytes.

Des monocytes THP-1 ont été traités en présence de LPS à une concentration de 100 ng/ml, de 15 à 60 minutes de stimulation. Pour chaque temps d'incubation en présence de LPS, un contrôle (cellules non traitées) a été prévu (**Figure III.7**). A la fin des stimulations, l'extraction des protéines nucléaires est lancée, puis un dosage de la quantité de protéines pour chaque échantillon est réalisé. Ensuite, un test Trans-AM® est effectué, permettant d'évaluer la liaison à l'ADN de NF- κ B.

On observe que la liaison à l'ADN augmente de manière progressive avec la durée de stimulation en présence de LPS, de 30 à 60 minutes, et ce avec les deux anticorps utilisés.

Lorsqu'on compare les figures III.4 et III.7, nous pouvons faire deux observations majeures : bien qu'il soit difficile de comparer les valeurs de DO d'une expérience à l'autre, on constate néanmoins que l'activité basale détectée avec l'anticorps p50 est bien plus élevée chez les macrophages que chez les monocytes. De plus, les différences observées avec les deux anticorps pour les macrophages, semblent par contre moins flagrantes avec les monocytes.

Enfin, comme pour les macrophages, nous avons voulu tester le BAY 11-7082. Les monocytes THP-1 ont tout d'abord été pré-incubés en présence de BAY 11-7082, à une concentration de 25 μ M, puis stimulés avec le LPS (**Figure III. 8**). Comme mentionné plus haut, nous suivrons ici la liaison à l'ADN avec les anticorps anti-p50 et anti-p65.

Tout d'abord, nous observons une augmentation de la liaison à l'ADN de NF- κ B de 4,2 fois avec l'anticorps anti-p50 et de 8,3 fois avec l'anticorps p65 par rapport au contrôle pour les cellules incubés 45 minutes en présence de LPS seulement. La pré-incubation des cellules en présence de BAY 11-7082, suivie d'une stimulation au LPS provoque, quant à elle, une diminution de $\pm 1,6$ fois de l'activité de liaison à l'ADN de NF- κ B.

Même si le BAY 11-7082 n'exerce qu'une inhibition partielle de l'activité de liaison à l'ADN de NF- κ B, elle semble nettement supérieure à celle que nous avons constatée pour les macrophages (**Figure III. 7**).

Nous avons donc obtenu un modèle de stimulation des monocytes THP-1, pour lequel nous observons une diminution significative de l'activation de NF- κ B en présence du BAY 11-7082. Cette inhibition pourra être comparée aux effets potentiellement anti-inflammatoires des cardénolides testés sur ce modèle de cellules.

1.4 Effets des cardénolides sur l'activité de liaison à l'ADN de NF- κ B lors d'une stimulation de monocytes au LPS

A partir des conditions validées ci-dessus, nous avons voulu tester les effets des cardénolides sur la voie d'activation de NF- κ B. Nous avons donc testé ces molécules sur le modèle de monocytes pré-incubés 30 minutes en présence des trois cardénolides, aux différentes concentrations précitées, et ce dans les monocytes stimulés au LPS à 100 ng/ml pendant 45 minutes.

Les résultats sont donnés à la figure III.9. Si l'on compare les données de la figure III.9 avec la figure III.8, on constate une discordance : le niveau d'activation pour les cellules monocytaires non traitées est beaucoup plus élevé dans la figure III.9. Nous remarquons cependant un effet inhibiteur du BAY 11-7082.

Par contre, les trois cardénolides testés, aux différentes concentrations utilisées, ne montrent aucun effet inhibiteur. Signalons à cet égard qu'un examen morphologique des cellules avant l'extraction protéique, nous a permis de remarquer que les cellules ayant été incubées en présence de UBS1450, à une concentration de 1 μ M, puis stimulées au LPS, étaient devenues adhérentes après ces traitements, contrairement à ce que l'on pouvait observer dans les autres conditions.

Discussion

Les résultats obtenus avec les cardénolides ne concordent donc pas à première vue avec les résultats obtenus chez Unibioscreen. En effet, Mijatovic et al. (2006) observent que le composé « UBS 1450 » inhibe spécifiquement l'activation constitutive de NF- κ B, et cela sur les cellules A549 (cellules épithéliales humaines de carcinomes de poumons), à une concentration de 10 nM. L'inhibition de cette activation s'effectue à plusieurs niveaux (Mijatovic et al. 2006) :

- augmentation de l'abondance d'I κ B β ,
- diminution de la phosphorylation d'I κ B α ,
- diminution de l'expression de l'ubiquitin-conjugating enzyme impliquée dans la dégradation d'I κ B,
- diminution de l'expression de p65,
- diminution de la phosphorylation de p65 (phosphorylation sur la sérine 275, nécessaire à la liaison de NF- κ B à l'ADN),
- diminution de l'activité transcriptionnelle de NF- κ B.

Les cellules A549 sont traitées pendant 3 jours en présence de l'UBS 1450 (Mijatovic et al. 2006). Ces auteurs n'ont pas effectué les analyses pour les molécules UBS 3529 et UBS 3530.

Contrairement à ce qu'avait montré cette équipe, nous ne sommes pas en mesure de montrer une activité anti-NF- κ B des molécules UBS 1450, 3530 et 3529 sur le modèle monocyttaire utilisé.

Le modèle cellulaire utilisé dans ce travail, bien que plus relevant dans le contexte de l'inflammation, est très différent, ainsi que les temps d'incubation testés. Enfin, nous avons évalué les effets inhibiteurs sur l'activité de liaison à l'ADN induite par le LPS. Des problèmes de contamination avec des mycoplasmes nous ont empêchés de poursuivre cette partie du mémoire. Il est clair que nous devons encore évaluer les cardénolides sur l'activité constitutive de NF- κ B, et après des temps d'incubation plus longs dans les monocytes/macrophages, comme pour les cellules A549. Si dans ces conditions, on observe des effets, nous pourrions envisager de tester les effets des cardénolides sur les profils

d'expression, via les damiers DualChip® Human Inflammation dans les cellules THP-1 et A549.

2 Etude des contributions spécifiques des voies inflammatoires NF- κ B et PI3K dans la réponse d'un modèle de monocytes / macrophages stimulés au LPS

2.1 Modèle cellulaire

Dans cette partie du mémoire, le modèle cellulaire utilisé est la souche de macrophages murins RAW 264.7. Ces cellules sont couramment utilisées dans les recherches effectuées dans le cadre de l'athérosclérose et dans les études menées sur les voies de transduction du signal activées par le LPS (Sweet and Hume 1996; Kim et al. 2005).

Ces cellules sont très semblables du point de vue morphologique aux macrophages humains (**Figure II.1 et II.3**), mais aussi d'un point de vue biochimique, comme en attestent les données de la littérature (Sweet and Hume 1996; Guha and Mackman 2001).

Ce modèle a d'ailleurs été utilisé au laboratoire pour valider un damier à ADN, la Dualchip® Mouse Inflammation. Dans ce but, des macrophages RAW 264.7 ont été stimulés avec du LPS (1 μ g/ml) pendant 4 heures et les profils d'expression génique analysés. Ce damier porte 233 sondes de capture correspondant à des gènes décrits dans la littérature pour jouer un rôle dans les processus inflammatoires (Dos Santos et al., 2006).

Etant donné la complexité de la signalisation liée au LPS et les diverses voies activées (NF- κ B, voie PI3K/Akt, voie mTOR) et étant donné l'outil puissant que constitue le damier Dualchip® Mouse Inflammation, nous allons tester différents inhibiteurs interférant avec ces voies (**Figure III. 10**) et voir comment ils affectent les profils d'expression génique induits par le LPS. Mais avant de lancer les expériences d'hybridation sur damiers, nous avons évalué la cytotoxicité de ces molécules dans les cellules RAW 264.7.

2.2 Evaluation de la cytotoxicité des inhibiteurs chimiques sur les macrophages murins

La concentration subcytotoxique des quatre inhibiteurs chimiques, le BAY 11-7082, le LY294002, la wortmannine et la rapamycine sur les RAW 264.7 a été estimée à l'aide d'un test colorimétrique MTT, après que les cellules aient été incubées pendant 6 heures en présence des inhibiteurs (**Figure III. 11**).

Tout d'abord, nous remarquons que la mortalité induite par l'ajout de BAY 11-7082 à une concentration de 12 μ M est de l'ordre de 30 % par rapport aux cellules contrôle. A une concentration de 25 μ M, on observe 85 % de mortalité. Le BAY 11-7082 est donc une molécule très cytotoxique à cette concentration pour les macrophages RAW 264.7.

Deux concentrations en LY294002 ont été testées sur les RAW 264.7. En présence d'une concentration de 25 et de 50 μ M, environ 60 % de la population cellulaire était toujours métaboliquement active.

Lors des traitements en présence de wortmannine et de rapamycine, des concentrations de 0,1, 1 et 10 μ M ont été testées. La viabilité cellulaire ne semble pas être affectée lors du traitement de ces cellules en présence de wortmannine. En effet, le pourcentage de cellules ayant survécu, pour les 3 concentrations testées, est comparable au contrôle. Par contre, une incubation de 6 heures des cellules RAW 264.7 en présence de rapamycine 10 μ M ne sera pas retenue lors des analyses futures. En effet, seulement 10 % des cellules traitées ont survécu.

En conséquence, dans les expériences suivantes qui visent à tester les inhibiteurs sur la réponse des cellules RAW 264.7 au LPS, les concentrations suivantes en inhibiteurs ont été retenues :

- BAY 11-7082 : 12 μ M
- LY294002 : 25 μ M
- Wortmannine : 1 μ M
- Rapamycine : 1 μ M

La concentration retenue en BAY 11-7082 est proche de l'IC₅₀ (10,5 μ M) décrite dans la littérature (Pierce et al. 1997).

Par contre, la concentration sélectionnée pour le LY294002, est supérieure à l'IC₅₀ déterminé par Vlahos et al (1994) (IC₅₀ de l'ordre de 1.4 μ M).

Mais il faut signaler des différences selon le type cellulaire. Par exemple, Adi et son équipe (2001) constatent que, pour obtenir une inhibition de la phosphorylation d'Akt, une concentration en LY294002 de 100 μ M est nécessaire (Adi et al. 2001). En revanche, nous avons trouvé plusieurs travaux sur les cellules RAW 264.7 utilisant également le LY294002 à la concentration 25 μ M (Salh et al. 1998; Kim et al. 2005; Hazeki et al. 2006).

Les concentrations retenues en wortmannine et rapamycine sont bien plus élevées que leurs IC₅₀ respectifs (de 2 à 4 nM et de 1 à 9 nM respectivement). Salh et al. (1998) utilisent des concentrations en wortmannine et rapamycine de 60 nM (25 ng/ml) et de 50 nM respectivement (Salh et al. 1998). Adi et son équipe obtiennent une inhibition de moitié de la phosphorylation d'Akt par la PI3K après stimulation à l'insuline, avec de la wortmannine à 50 nM (Adi et al. 2001). Par contre, certains auteurs utilisent une concentration en wortmannine de 500 nM (Kim et al. 2005). A cette concentration, ils observent une diminution de la phosphorylation d'Akt d'un facteur trois fois.

D'autres études portant sur la réponse au LPS de macrophages péritonéaux utilisent une concentration en wortmannine allant jusqu'à 100 nM (Hazeki et al. 2006).

Bien que la concentration en rapamycine utilisée dans ce mémoire est plus élevée que l'IC₅₀, la plupart des travaux portant sur la réponse au LPS de RAW 264.7 en présence des inhibiteurs précités utilisent aussi cette même concentration de 1 μ M. Les concentrations des autres inhibiteurs indiquées dans cet article sont comparables à celles utilisées au cours de notre travail (Weinstein et al. 2000).

De plus, une étude a démontré que l'inhibition de l'activité de différentes cibles protéiques de la voie des PI3Ks, par ses inhibiteurs de référence, LY294002 et wortmannine, ne s'effectue nécessairement aux mêmes concentrations. Par exemple, ces auteurs ont démontré que si une concentration donnée pouvait engendrer une inhibition complète de l'activité de la P70/S6K, l'inhibition de la phosphorylation d'Akt à cette concentration n'est pas totale. Cela suggère que la phosphorylation de la p70/S6K demande un état d'activation élevé de la protéine Akt (Adi et al. 2001).

Par contre, il a été mis en évidence une action directe des inhibiteurs LY294002 et wortmannine sur l'activation de la protéine mTOR (Brunn et al. 1996), bien que cet effet soit surtout reconnu pour le LY294002 (Vanhaesebroeck et Waterfield, 1999).

2.3 Effets des inhibiteurs sur l'activité de liaison à l'ADN de NF- κ B induit par le LPS

Avant de tester les inhibiteurs sur la réponse des cellules RAW 264.7, nous avons voulu préciser les conditions de stimulation avec le LPS.

Le but de cette expérience était donc de valider un temps de stimulation des cellules RAW 264.7 avec le LPS pour lequel nous observons une activation significative de NF- κ B. Une cinétique de stimulation a donc été effectuée. Les temps choisis s'étendaient de 15 minutes à 2 heures de stimulation. Pour chaque temps de stimulation, nous avons prévu des cellules non stimulées, comme contrôle. A la fin de cette cinétique, les protéines nucléaires ont été extraites, par la méthode décrite au point 3.1.2 du Matériels et Méthodes. Ensuite, un dosage protéique par la méthode de Bradford a été effectué, afin de connaître la concentration en protéines de chaque échantillon. Enfin, un test Trans-AM® de liaison à l'ADN de NF- κ B a été réalisé, dans le but d'estimer l'activation de ce facteur de transcription en présence de LPS dans cet intervalle de temps. Nous suivions la liaison à l'ADN avec des anticorps anti-p50 et anti-p65.

Comme le montre la figure III.12, nous n'observons aucune activité de liaison avec l'anticorps anti-p50. Par contre, avec l'anticorps anti-p65, on observe une activation rapide et soutenue à partir de 15 minutes de stimulation de la liaison à l'ADN (de 4 x par rapport au contrôle) (**Figure III.12**). A 30 minutes en présence de 100 ng/ml de LPS, nous observons une augmentation de 4,2 x de la liaison à l'ADN de NF- κ B par rapport au contrôle. A 45 minutes de stimulation, la liaison à l'ADN de p65 se maintient à un niveau 2,4 x supérieur au contrôle. Cette activité se maintient au cours des stimulations à une et deux heures.

Pour les expériences ultérieures, nous stimulerons les RAW 264.7 30 minutes en présence de LPS à une concentration de 100 ng/ml, temps présentant la plus forte activation. De plus, il ne sera pas nécessaire de suivre la liaison à l'ADN avec les anticorps anti-p50 dans les tests de Trans-AM®. En effet, cette sous-unité de NF- κ B semble très faiblement exprimée dans les macrophages murins RAW 264.7. Il semblerait donc que p65 soit associé à une autre sous-unité de NF- κ B dans ce type cellulaire.

La voie d'activation de NF- κ B est centrale dans la réponse de monocytes/macrophages au LPS (Guha and Mackman 2001). Cependant, cette voie de transduction du signal est régulée par d'autres voies de signalisation cellulaire, telles que la voie PI3K/Akt. C'est pourquoi nous avons évalué l'activation de NF- κ B en présence des différents inhibiteurs, LY 294002, wortmannine et rapamycine.

Tout d'abord, les cellules ont été pré-incubées une heure en présence de BAY 11-7082 12 μ M, de LY294002 25 μ M, de wortmannine 1 μ M et de rapamycine 1 μ M, puis stimulées 30 minutes avec le LPS. Après extraction et détermination de la quantité de protéines nucléaires, le dosage de la liaison à l'ADN NF- κ B a été effectué, à l'aide de 5 μ g de protéines par puits.

On observe toujours une augmentation de la liaison de NF- κ B à l'ADN dans les cellules stimulées au LPS 100 ng/ml, bien qu'elle soit plus faible que dans l'expérience précédente (2,4 x supérieure au contrôle) (**Figure III.13**).

La pré-incubation des cellules en présence de BAY 11-7082, inhibiteur de la phosphorylation d'I κ B (Pierce et al. 1997), prévient l'activation de NF- κ B, même si l'inhibition n'est pas totale.

Par contre, en présence des deux inhibiteurs chimiques de la voie PI3K (LY294002, wortmannine), et de la rapamycine, nous n'observons pas d'inhibition significative de la liaison de NF- κ B à l'ADN.

Discussion

Ce résultat suggère donc que, même s'il a été remarqué par certains auteurs (Guha and Mackman 2001) que d'autres voies de transduction du signal, telles que les voies de la PI3Ks, interviennent dans le signalisation induite par le LPS, ces voies n'influenceraient pas l'étape

de translocation de NF- κ B au noyau, du moins pour la sous-unité p65. Les acteurs de ces voies secondaires pourraient dès lors agir sur l'activité transactivatrice du facteur de transcription, lorsque celui-ci est déjà lié à l'ADN (Guha and Mackman 2001).

Nos résultats sont en accord avec les données de Kim et son équipe (2005) en ce qui concerne la wortmannine. Par contre, pour le LY294002, ces auteurs observent un effet sur l'activité de liaison de NF- κ B sur l'ADN, sur le même modèle cellulaire, et à la même concentration en LY294002. Toutefois, ils déterminent l'activité de liaison de NF- κ B par la méthode du retard sur gel, alors que nous ne détectons que les dimères NF- κ B contenant la sous-unité p65. Ils observent également un effet du LY294002 sur l'activité transactivatrice du facteur NF- κ B (Kim et al. 2005).

C'est pourquoi nous avons décidé de passer à des analyses sur système rapporteur. Elles nous permettront d'étudier l'influence des voies PI3K/Akt et de mTOR sur l'activité transactivatrice de NF- κ B. Cependant, l'utilisation d'un système rapporteur nécessite la transfection des cellules RAW 264.7. Celle-ci n'avait pas encore été réalisée au laboratoire, c'est pourquoi il nous fallait mettre au point cette étape essentielle.

2.4 Mise au point de la transfection des macrophages murins RAW 264.7

La mise au point de conditions de transfection nécessite l'optimisation de plusieurs conditions, dont l'agent transfectant, la densité cellulaire, la présence ou non de sérum, les rapports « ADN – Agent transfectant », la quantité d'ADN, ...

En effet, la transfection est médiée par des complexes « ADN – polymères cationiques synthétiques » (ou polyplexes) ou par des complexes « ADN – lipides cationiques » (lipoplexes). Les agents de transfection ne sont pas inertes vis-à-vis de la cellule. En effet, pour certains types cellulaires, certains agents de transfection sont plus conseillés (en présence ou non de sérum), car des effets cytotoxiques peuvent apparaître. C'est pourquoi le choix d'un agent de transfection parmi une large gamme doit être réalisé.

2.4.1 Choix de l'agent transfectant

Nous avons testé quatre agents de transfection : le FuGène 6, le Superfect (Figure II.7), la lipofectine, et la lipofectamine 2000 (Tableau II. 5). Pour chaque agent, la transfection a été comparée à deux densités cellulaires (150.000 cellules et 250.000 cellules par puits en plaques 12 puits), pour trois rapports « ADN-agent transfectant », en présence ou non de sérum. Les différentes conditions testées sur RAW 264.7 sont résumées dans le tableau II.3 (voir Matériels et Méthodes).

La mise au point de ces conditions de transfection a été effectuée avec le plasmide pCMV- β Gal, portant le gène encodant la β -Galactosidase, sous le contrôle d'un promoteur fort, celui du CMV (cytomégalovirus).

Une fois des conditions de transfection simple retenues, des essais de double transfection en présence des plasmides pCVM- β Gal et pNF- κ B-Luc seront envisagés (Figure II.6b).

2.4.1.1 Mise au point de transfection en présence du FuGène 6

Des macrophages murins RAW 264.7 ont été transfectés à l'aide du FuGène 6. Deux densités cellulaires ont été testées (150.000 et 250.000 cellules par puits en plaque 12 puits), en présence ou non de sérum, et avec 3 rapports « ADN - agent transfectant » (1:3, 2:3, 1:6) (Figure III.14).

Nous observons que la densité optique à 405 nm, correspondant à l'activité β -Galactosidase, est généralement la plus élevée pour le rapport « ADN – FuGène 6 » 1:6. De

plus, les signaux sont plus élevés, lorsque la transfection est effectuée en l'absence de sérum dans le milieu de culture.

L'activité β -Galactosidase la plus élevée correspond aux conditions suivantes : cellules repiquées à 250.000 cellules par puits, transfection en absence de sérum, et en présence de complexes réalisés à partir d'un rapport « ADN – FuGène6 » de 1:6. Malheureusement, nous avons constaté, en observant les cellules au microscope, une cytotoxicité proportionnelle à la quantité de FuGène 6 ajoutée. Cette toxicité était maximale à 6 μ g de FuGène 6.

En conclusion, même si les conditions précitées semblaient intéressantes, nous ne les avons pas retenues à cause d'un problème de toxicité cellulaire trop important.

2.4.1.2 Mise au point de transfection en présence du Superfect

Lors de la transfection des cellules RAW 264.7 à l'aide du Superfect, deux densités cellulaires ont été testées (150.000 cellules et 250.000 cellules par puits en plaque 12 puits), en présence ou non de sérum, et à trois rapports « ADN – Superfect » (1:2, 1:4, 1:6) (**Figure III. 15**). Premièrement, nous pouvons observer que l'activité β -Galactosidase diminue lorsque la proportion d'agent transfectant augmente. De plus, pour les faibles quantités en Superfect, les activités β -Gal les plus élevées, sont relevées pour les cellules cultivées à 250.000 cellules par puits.

En outre, un effet cytotoxique du Superfect pour les rapports 1:4 et 1:6 a aussi été observé sur les cellules par examen au microscope.

L'activité β -Gal maximale a été obtenue lors de la transfection de RAW 264.7, en présence de sérum, à 250.000 cellules par puits et pour un rapport « ADN – Superfect » de 1:2 (**Figure III.14**).

Nous garderons ces conditions de transfection pour les tests de double transfection ultérieurs.

2.4.1.3 Mise au point de transfection en présence de la lipofectine

Un test de transfection a été lancé à l'aide de la lipofectine, aux mêmes densités cellulaires citées précédemment, avec ou sans sérum, mais à des rapports en « ADN – Agent transfectant » de 1:2, 1:4 et de 1:6. La densité optique corrélée à l'activité β -Galactosidase restait très basse, et cela pour toutes les conditions testées, reflétant de très faibles taux de transfection. L'utilisation de cet agent n'a donc pas été retenue pour nos essais ultérieurs.

2.4.1.4 Mise au point de transfection en présence de la Lipofectamine 2000

Comme pour les autres agents de transfection, 2 densités cellulaires (150.000 et 250.000 cellules par puits), avec ou sans sérum, à 3 rapports « ADN – Agent transfectant » (1:1, 1:2, 1:4) ont été testés afin d'optimiser les conditions de transfection avec la Lipofectamine (**Figure III.16**).

Tout d'abord, nous pouvons remarquer que l'activité β -galactosidase augmente lors de l'ajout d'une quantité croissante de Lipofectamine 2000 pour la formation des complexes. De plus, les cellules semblent mieux tolérer la présence de sérum pendant la transfection, comparativement aux autres agents testés. Il est important de noter la différence d'échelle par rapport aux expériences précédentes : en effet, si dans les tests de mises au point en présence du FuGène6 et du Superfect la densité optique maximale obtenue était de 1,2 pour le Superfect et de 0,93 pour le FuGène 6, ici, nous atteignons un niveau de densité optique proche de 1,6.

Nous retenons donc les conditions suivantes pour la transfection en présence de Lipofectamine 2000: rapport 1:4, avec sérum, à 150.000 cellules par puits.

Nous avons préféré la densité plus faible de 150.000 cellules par puits, car dans les expériences futures, les cellules devront encore être stimulées après la transfection, ce qui requiert des conditions subconfluentes.

A l'aide des conditions déterminées ci-dessus, un test de transfection simple des cellules RAW 264.7 avec le plasmide β -Galactosidase, a été effectué avec révélation histochimique de l'activité β -Galactosidase, réalisée le lendemain de la transfection. Il permet d'effectuer un comptage précis des cellules transfectées sur la population entière, et nous permet dès lors de connaître le pourcentage de cellules transfectées (**Figure III.17**). Après comptage du nombre de cellules totales ainsi que des cellules bleues, nous avons obtenu une efficacité de transfection de 10 %. Le taux de transfection reste donc relativement faible comparé à des souches cellulaires telles que les cellules COS-7 de rein de singes (transfectées au Superfect), dont le taux de transfection atteint les 20 à 30 % (Zhu and Craft 2000).

De plus, lorsqu'on examine les cellules au microscope le lendemain de la transfection, elles présentent une morphologie de cellules activées, formant des pseudopodes ainsi que des vacuoles. Elles s'étendent, deviennent rondes et aplaties (**Figure III.18**).

2.4.1.5 Essais de double transfection

Comme le montrent les résultats du paragraphe précédent, nous avons obtenu les meilleurs résultats en transfection simple avec le Superfect et la Lipofectamine 2000. Jusqu'à présent, nous avons utilisé le plasmide pCMV- β Gal. Le but de ces mises au point est de transfecter les cellules avec un plasmide portant un gène rapporteur en aval d'un promoteur sous le contrôle de NF- κ B, afin d'étudier l'activité transactivatrice de ce facteur de transcription.

Les conditions de transfection simple déterminées, nous avons donc réalisé des tests de double transfection avec un plasmide β -Galactosidase et un plasmide portant le gène rapporteur encodant la luciférase en aval d'un promoteur synthétique à 5 séquences consensus de liaison à l'ADN de NF- κ B. Cette double transfection permet de rapporter l'activité luciférase (NF- κ B-dépendant) à l'activité β -Galactosidase, pour minimiser les différences éventuelles d'efficacité de transfection.

Ces essais de double transfection ont été réalisés avec le Superfect et la Lipofectamine 2000 (résultats non montrés), en variant les densités cellulaires (150.000 et 250.000 cellules par puits par plaque 12 puits), ainsi que les rapports entre les deux plasmides. Le lendemain de la transfection, les cellules sont mises au repos trois heures dans un milieu à 1 % de sérum, puis stimulées pendant 24 heures avec le LPS (10 ng/ml ou 100 ng/ml). Les activités luciférase et β -Galactosidase sont alors mesurées.

Pour des raisons probablement liées à une toxicité excessive de la double transfection, nous ne sommes arrivés à aucun résultat concluant, ni avec le Superfect, ni avec la Lipofectamine 2000. Dès lors, pour tester les effets des inhibiteurs sur l'activité transactivatrice de NF- κ B dans les cellules RAW 264.7 stimulés avec du LPS, nous transfecterons préalablement les cellules avec le plasmide pNF- κ B-Luc, en transfection simple et nous rapporterons l'activité luciférase à la quantité de protéines. Notre choix s'est porté sur la Lipofectamine 2000 comme agent transfectant, étant donné qu'il donnait des résultats les plus satisfaisants avec le plasmide pCMV- β Gal.

2.5 Effets des inhibiteurs sur l'activité transactivatrice de NF- κ B

Les macrophages murins RAW 264.7 ont été transfectés à l'aide de la Lipofectamine 2000, avec le plasmide pNF- κ B-Luc selon les conditions mises au point au paragraphe précédent. Le lendemain de la transfection, les macrophages mis au repos une demi-journée sont stimulés en présence de LPS à une concentration de 10 ng/ml, pendant une nuit. Ensuite, la révélation de l'activité luciférase des cellules transfectées est effectuée le lendemain. Les lysats cellulaires sont conservés et un dosage protéique à la méthode de Bradford est ensuite réalisé, afin de rapporter l'activité luciférase de chaque échantillon à la quantité de protéines provenant de chaque puits.

Nous observons comme attendu une augmentation – bien qu'assez faible - de l'activité luciférase des cellules transfectées avec le plasmide pNF- κ B-Luc et stimulées avec le LPS (**Figure III.19**).

La transfection simple d'un plasmide pNF- κ B-Luc à l'aide de la Lipofectamine 2000, en présence de sérums, et avec un rapport « ADN – Lipofectamine 2000 » de 1:4, sera donc retenue pour les expériences suivantes, afin de tester l'effet des inhibiteurs utilisés dans ce mémoire, ce qui nous permettra d'évaluer l'effet de ceux-ci sur l'activité transactivatrice de NF- κ B.

24 heures après transfection avec la Lipofectamine 2000, les cellules sont mises au repos dans un ml de milieu à 1 % de sérum, et cela pendant une demi-journée. Ensuite, une première heure de pré-incubation des cellules en présence des inhibiteurs seuls est réalisée. Les cellules sont alors stimulées au LPS, à une concentration de 10 ng/ml. L'incubation en présence de LPS est interrompue le lendemain matin.

Tout d'abord, nous observons une augmentation de l'activité luciférase lors du traitement des cellules en présence de LPS seul. En effet, comme pour les essais de transfection simple en présence du plasmide pNF- κ B-Luc, l'ajout de LPS au milieu de culture provoque une augmentation de deux fois de l'activité transcriptionnelle de NF- κ B (**Figures III-19 et III.20**).

Nous observons également une faible inhibition de cette activité transcriptionnelle lors du pré-traitement des cellules en présence du BAY 11-7082, bien que celle-ci ne soit pas significative. En effet, les valeurs d'activité luciférase pour ces échantillons sont variables, probablement vu l'effet cytotoxique du BAY 11-7082 lors d'un traitement prolongé des RAW 264.7 à cet inhibiteur. En parallèle, le BAY 11-7082 seul n'induit pas de diminution significative de l'activité transcriptionnelle basale de NF- κ B.

Alors que le LY294002 n'avait pas d'effet sur l'activité de liaison de NF- κ B à l'ADN, nous observons bien un effet marqué sur l'activité transactivatrice de NF- κ B. Il faut cependant attirer l'attention sur la toxicité du LY294002 lorsqu'il est combiné à un protocole de transfection. Nous ne sommes donc pas en mesure de dire si cette diminution est bien due à une influence de la voie PI3K sur l'activité transcriptionnelle de NF- κ B ou si cette diminution est due à une mortalité élevée parmi la population cellulaire.

En revanche, même si la wortmannine est un inhibiteur notoire de la même voie de transduction du signal, la pré-incubation des cellules en présence de cet inhibiteur ne semble pas influencer l'activation transcriptionnelle de NF- κ B. Ces 2 inhibiteurs ont donc des actions distinctes (Kim et al. 2005; Hazeki et al. 2006).

De plus, la rapamycine, inhibiteur de mTOR, enzyme activatrice de la traduction, augmente l'activité transcriptionnelle de NF- κ B, induite par le LPS. De même, le traitement des cellules en présence de rapamycine seule, augmente le niveau d'activité luciférase au niveau des cellules non stimulées au LPS.

Discussion

Nous avons essayé de confronter nos résultats aux données de la littérature. La question du rôle de la voie PI3K/Akt et de la voie mTOR dans la signalisation en aval du TLR4 et de NF- κ B reste très controversée. En général, on considère que la voie PI3K régule positivement l'activation de NF- κ B induite par le LPS (Manna and Aggarwal 2000), mais des travaux plus récents suggèrent aussi des mécanismes de régulation négative : des inhibiteurs chimiques ou des siRNA ciblés sur la voie PI3K, amplifient dans ce cas la réponse induite par le LPS (Kim et al. 2005; Hazeki et al. 2006).

Enfin, de plus en plus d'auteurs signalent des effets non attendus, en particulier pour le LY294002, qui pourrait exercer des effets indépendants des PI3K, via des mécanismes non élucidés.

Quant aux effets que nous observons avec la rapamycine, ils sont en accord avec les travaux de Minhajuddin et son équipe (2005) (Minhajuddin et al. 2005). Ces auteurs montrent en effet, que la rapamycine favorise l'activation et la stabilisation de NF- κ B.

Enfin, Salh et son équipe (1998) suggèrent que le LY294002 pourrait inhiber le complexe mTOR, de manière PI3K indépendante (Salh et al. 1998). mTOR fait effectivement partie de « PI3K-related » kinases (de classe IV). Les enzymes de cette classe présentent des homologies avec les PI3Ks, mais elles phosphorylent des protéines. Elles sont également sensibles au LY294002.

2.6 Effets des inhibiteurs des voies PI3K/Akt et mTOR sur les profils d'expression génique de macrophages murins RAW 264.7

Nous venons de montrer que les différents inhibiteurs des voies NF- κ B et PI3K/Akt régulent à différents niveaux, l'état d'activation du facteur de transcription NF- κ B induit par le LPS. Nous voulons à présent savoir quels sont les effets de ces inhibiteurs sur l'expression des gènes induits par le LPS, et en particulier sur l'expression de ceux sous le contrôle de ce facteur de transcription.

Pour cela, différentes approches peuvent être envisagées afin d'effectuer des études sans *a priori* de l'expression de gènes. D'une part, il est possible d'analyser, à l'aide de la technique des gels bidimensionnels, l'ensemble des protéines produites à un moment donné, dans des conditions données, dans un type cellulaire donné. Il s'agit de l'approche protéomique. D'autre part, il est possible d'étudier l'ensemble des transcrits exprimés dans une cellule à un moment donné, par une approche transcriptomique.

Ces 2 approches sont complémentaires, car elles apportent des informations sur deux niveaux d'expressions distincts, mais il est difficile de corrélérer les résultats, car l'expression au niveau ARNm n'est pas toujours corrélée avec l'expression au niveau protéique. En outre, les analyses transcriptomiques ne donnent pas d'informations sur les modifications post-traductionnelles que la protéine peut subir.

Dans le cadre de ce travail, nous avons utilisé des damiers à ADN de moyenne densité commercialisés par la firme Eppendorf, les DualChip® Mouse Inflammation, comprenant quelques 233 sondes de capture correspondant à des gènes spécifiquement impliqués dans des processus inflammatoires.

Nous avons effectué deux hybridations indépendantes d'ARN provenant de cultures de macrophages murins RAW 264.7 pré-incubés une heure en présence des différents inhibiteurs chimiques utilisés au cours de ce mémoire, à savoir, le BAY 11-7082 (12 μ M), le LY294002 (25 μ M), la wortmannine (1 μ M), et la rapamycine (1 μ M), et stimulés 6 heures en présence de LPS à une concentration de 100 ng/ml (**Figure III. 21a et b**).

L'analyse du damier nécessite une série de contrôles positifs et négatifs d'hybridation, de détection, 6 standards internes à différentes concentrations (contrôle pour la rétro-transcription), ainsi que des sondes de capture pour une série de gènes de maintenance, ou « house-keeping genes » (HKG), c'est-à-dire des gènes dont on pense que l'expression ne varie pas dans les diverses conditions testées. Les contrôles d'hybridation positifs permettent de contrôler que l'hybridation s'est bien déroulée. Les contrôles positifs de détection sont des oligonucléotides biotinylés fixés sur le damier à ADN, qui donnent une courbe de concentration. Ces sondes apparaîtront toujours lors de la révélation, sauf dans le cas d'un problème de « spotting ». Les contrôles négatifs de détection correspondent à du tampon, ne contenant aucune séquence.

Chaque damier a été scanné à trois gains différents (100, 70 et 50), ce qui permet d'augmenter artificiellement l'intervalle de détection des spots. En effet, une fois les images scannées, le programme ImaGene 5.5 permet la quantification des signaux de fluorescence de chaque spot : il y a 65.535 niveaux de quantification. La gamme de détection d'un signal est arbitrairement fixée entre la valeur correspondant à deux fois le bruit de fond et le niveau 50.000. Les différents gains permettent d'assurer la détection d'un maximum de spots : les gènes faiblement exprimés seront détectés aux gains les plus grands et les gènes fortement exprimés seront détectés aux gains les plus faibles.

Les ratios (condition test/condition CTL) qui seront donnés ci-dessous, peuvent être divisés en deux catégories. Nous parlerons de **ratios quantitatifs** lorsqu'à au moins un des gains, les signaux de fluorescence pour un gène dans les deux conditions, se retrouvent dans l'intervalle de détection (c.à.d. entre deux fois le bruit de fond et 50.000). Les ratios seront alors annotés sous forme chiffrée.

Nous parlerons de **ratios qualitatifs** lorsque, à chaque gain, un des signaux de fluorescence dans une des conditions est en dessous de 2 X fois le bruit de fond ou au-dessus de 50.000. C'est le cas par exemple de gènes très faiblement exprimés dans la condition contrôle, mais très fortement surexprimés après traitement. Dans ce cas, la valeur du ratio sera annotée comme suit : $1 < + < 9$, $10 < ++ < 99$, $100 < +++ < 999$, $1000 < ++++ < 9999$, $10000 < +++++ < 99999$.

Nous avons observé des variations dans l'expression de plusieurs gènes en réponse au LPS. Effectivement, sur les 233 gènes représentés sur ce damier, 113 gènes répondaient à une stimulation au LPS, les 119 autres ne montraient pas de variation d'expression génique au cours de ce traitement.

Les différents inhibiteurs utilisés modulent cette réponse au LPS de façon plus ou moins spécifique. Nous allons présenter les résultats en trois parties :

- les gènes dont on observe une sous- ou surexpression en présence du LPS,
- les gènes dont l'expression génique est sous le contrôle du facteur de transcription NF- κ B (et donc sensibles au BAY 11-7082),
- les gènes dont l'expression est régulée par les inhibiteurs intervenant dans la voie des PI3Ks et mTOR.

2.6.1 Gènes sous- et surexprimés en présence de LPS

Parmi les 113 gènes dont l'expression est influencée par le LPS, on retrouve 27 gènes dont l'expression est réprimée en réponse au LPS, parmi lesquels on retrouve les gènes codant pour le récepteur au TNF de la super-famille 11a (-3 fois), le récepteur α à l'IL-6 (-2,95 fois), la protéine IRAK1 (-1,85 fois), le récepteur CD36 (récepteur « scavenger » de classe B) (-2,42 fois) et ICAM-1 (-1,59 fois). D'autre part, on retrouve dans le groupe des 86 gènes surexprimés lors d'un traitement au LPS, les gènes codant pour des cytokines pro-

inflammatoires, comme le TNF- α et l'IL-6, des chémokines (telles que le facteur MCP-1), des marqueurs d'inflammation (CRP, IL-18, ...), des acteurs des voies de transduction du signal, et d'autres gènes dont on a découvert récemment une implication dans l'inflammation (KITL, ENG ...).

Les tableaux III.1 (surexpressions quantitatives) et III.2 (surexpressions qualitatives) reprennent quelques gènes surexprimés dans les macrophages stimulés avec le LPS. Nous observons donc bien, une réponse de type inflammatoire caractéristique des macrophages en réponse au LPS. Effectivement, les gènes encodant des cytokines pro-inflammatoires, telles que **l'IL-6** (+++++), **l'IL-1 α** (+++++), **l'IL-1 β** (+++++) et le **TNF- α** (9,68 fois), ainsi que leurs récepteurs, dont certaines familles de récepteurs au TNF sont fortement surexprimés. Le TNF- α est une cytokine qui joue un rôle important dans les processus d'inflammation. Via ses récepteurs, dont il existe plusieurs familles, il va activer des voies de transduction du signal impliquées dans la réponse inflammatoire, dont la voie NF- κ B. Cette protéine active aussi la voie des MAPKs (Riches et al. 1996). L'équipe de Kopydlowski (1999) montre également que le traitement au LPS de macrophages régule la sécrétion de plusieurs cytokines, tant in vivo qu'in vitro (Kopydlowski et al. 1999).

Nous observons également la surexpression du gène encodant **l'IL-10** (+++++), une cytokine anti-inflammatoire. La sécrétion de cette cytokine aurait pour rôle de réguler et de limiter les dégâts tissulaires engendrés par le processus inflammatoire. Selon l'équipe d'Hamilton, l'IL-10 est un régulateur négatif de l'expression de gènes pro-inflammatoires. Il déstabilise les ARNm de ces gènes (Hamilton et al. 1999). Parallèlement, nous observons que le LPS, activant la voie NF- κ B, induit l'expression du gène codant pour la protéine inhibitrice **I κ B α** . Nous observons également la surexpression du gène encodant la protéine **BCL-3**, une I κ B-like protéine qui s'associe avec les homo-dimères p50 et p52. L'équipe de Kuwata (2003) a par ailleurs montré que BCL-3 était requis pour l'action suppressive de l'IL-10 sur la production de TNF- α dépendante de LPS dans des macrophages péritonéaux de souris (Kuwata et al. 2003). Ces auteurs ont aussi montré que l'expression de BCL-3 était induite par l'IL-10 et qu'elle régulait négativement l'expression du TNF- α , mais pas celle de l'IL-6. Cela suggère que la stimulation de macrophages murins RAW 264.7 avec du LPS, en augmentant, l'expression de gènes codant pour des protéines régulant négativement des voies de signalisation, dont celle de NF- κ B, assure également des mécanismes de feedback négatif sur ces voies (Wessells et al. 2004).

En plus de la surexpression de gènes encodant des cytokines pro- et anti-inflammatoires, nous observons également une nette surexpression de gènes encodant différentes chémokines, responsables du recrutement des monocytes et lymphocytes T aux sites d'inflammation. Le LPS induit l'expression des gènes encodant le MCP-1 (**CCL2**) (+++), MIP-1 α (**CCL3**) (++), MCP-3 (**CCL7**) (++++), ou encore RANTES (**CCL5**) (++++).

Nous remarquons aussi la surexpression de divers autres marqueurs de l'inflammation, comme les gènes codant pour le **CSF2** (+++++) et le **CSF3** (+++++), facteurs clés dans la prolifération et la différenciation des cellules monocytaires en macrophages (Hamilton and Anderson 2004).

La **MM9** (+++++) est également fortement surexprimée, ainsi qu'un inhibiteur de métallo-protéases, le **TIMP-1** (++++). Les métallo-protéases permettent aux macrophages de dégrader la MEC, permettant dès lors la migration trans-endothéliale des leucocytes dans le tissu enflammé. Nous observons aussi une augmentation de l'expression de **serpine-1** (serine

or cysteine proteinase inhibitor, aussi nommée PAI-1), inhibiteur de l'activateur du plasminogène. Le plasminogène est le précurseur de la plasmine, enzyme dégradant le réseau de fibrine. Le LPS induit également l'expression de gènes codant pour des enzymes synthétisant des facteurs collaborant à l'inflammation, comme la iNOS (**NOS2**) (+++++), produisant du NO, agent vaso-actif, et la COX2 (**PTGS2**) (+++++) produisant des prostaglandines, molécules pro-inflammatoires. Nous remarquons aussi que l'expression du gène codant pour le **fragment C3** du complément, composant essentiel à la mise en place de la réaction du complément, est induite lors de la réponse de macrophages murins au LPS.

A côté des acteurs de l'inflammation bien décrits dans la littérature, nous avons également observé la surexpression de gènes moins couramment étudiés dans les contextes inflammatoires. C'est le cas par exemple de l'**endogline** (ENG) (2,04 fois). Des recherches sur l'expression de cette glycoprotéine membranaire, associée au récepteur du TGF- β , ont montré une augmentation significative de l'expression de cette protéine dans des artères atteintes d'athérosclérose (Piao and Tokunaga 2006). D'autres études ont aussi montré l'augmentation de l'expression de l'endogline dans les blessures endothéliales induites dans des artères de porcs. De plus, l'endogline est nécessaire à la voie de transduction du signal activée par le TGF- β , car l'utilisation d'ARNs interférants dirigés contre cette protéine, contrecarre les effets anti-migratoires du TGF- β (Ma et al. 2000).

En plus d'activer le facteur de transcription NF- κ B, ainsi que l'expression génique du gène encodant la sous-unité **p50-p105**, le LPS induit la surexpression de gènes encodant des protéines impliquées dans d'autres voies de transduction du signal, telles que les kinases **JNKK1 et 2**, **JAK2** et le facteur de transcription **Egr1**. Coleman et son équipe avaient déjà montré que le LPS augmente l'abondance des transcrits du gène encodant Egr1 et des protéines Egr1 dans des macrophages péritonéaux de souris (Coleman et al. 1992).

Nos résultats sont donc globalement concordants avec les données de la littérature sur la réponse des cellules monocytaires au LPS (Sweet and Hume 1996; Hashimoto et al. 2003; Hall et al. 2005). Soulignons cependant qu'il s'agit d'analyses d'expression au niveau ARNm et que des validations de ces sur/sous-expressions devront être réalisées au niveau protéinique (par ELISA ou western blot), pour compléter ce travail préliminaire.

2.6.2 Intervention de la voie NF- κ B dans la régulation de l'expression génique

Après avoir établi le modèle inflammatoire sur les macrophages murins stimulés avec du LPS, nous avons voulu évaluer le rôle central du facteur de transcription NF- κ B dans les profils d'expression génique obtenus après stimulation au LPS. Pour cela, nous avons réalisé deux hybridations indépendantes d'ADNc obtenus à partir d'ARNm extraits de macrophages stimulés 6 heures au LPS en présence de l'inhibiteur de NF- κ B, le BAY 11-7082. Il s'agit donc de résultats préliminaires qui demandent confirmation, et par des hybridations supplémentaires et par validation par RT-PCR en temps réel (**Tableau III.3**).

Nous voyons un effet inhibiteur du BAY 11-7082 pour les gènes encodant l'IL-1 β , l'IL-10, le MIP-1 α , le MCP-1, le MCP-3, TIMP-1, RANTES, le CSF2, TIMP-1, la iNOS, la serpène-1, l'endogline, Bcl-3, et de 2 kinases (JNKK2 et JAK2) (**Tableau III.3**). Ces résultats sont cohérents avec les données de la littérature (voir par exemple, Barnes et Karin (1997), Hashimoto et al. 2003), mais il faut néanmoins souligner que l'inhibition par le BAY 11-7082 est parfois très faible, ce qui suggère l'implication d'autres voies ou des problèmes avec la préparation du BAY 11-7082 utilisée. Rappelons que nous avons déjà rencontré des

problèmes avec le BAY 11-7082 sur l'activation de NF- κ B. Par ailleurs, on pourrait augmenter la concentration en BAY 11-7082, mais en sachant qu'il faudra vérifier qu'elle n'entraîne pas de cytotoxicité excessive.

Par contre, nous obtenons des résultats inattendus : en présence du BAY 11-7082, on observe une surexpression du TNF- α , de l'IL-6, du CSF3, de la MMP9, de la COX-2, du fragment C3 du complément, et de la JNKK1. La plupart de ces gènes sont connus pour être régulés par NF- κ B et on se serait donc attendu à un effet négatif du BAY 11-7082. Par exemple Wu et son équipe ont montré que l'ajout de LPS à des macrophages issus de patients âgés provoque une augmentation de l'expression du gène codant pour la COX-2 et que l'ajout de BAY 11-7082 contrecarrait cette surexpression, avec une diminution de la production de PGE₂ (Wu et al. 2003). De même, Barnes et Karin (1997) ont démontré que l'expression des gènes codant le TNF- α , l'IL-6 est dépendante de l'activation de la voie NF- κ B.

Les effets du BAY 11-7082 montrent ici que NF- κ B est impliqué dans la régulation de gènes encodant des protéines intervenant dans des mécanismes favorisant les processus inflammatoires, mais que d'autres voies de transduction du signal peuvent aussi intervenir.

C'est pourquoi il nous fallait réaliser une analyse détaillée de la contribution des voies PI3K/Akt et mTOR, voies dont on sait qu'elles interviennent dans la signalisation induite par le LPS.

2.6.3 Intervention de la voie des PI3K/Akt et mTOR dans la régulation de l'expression génique

2.6.3.1 Gènes dont l'expression varie en présence de LY294002

Afin d'étudier le rôle des voies PI3K/Akt et mTOR dans la réponse au LPS de macrophages murins RAW 264.7, nous avons utilisé trois inhibiteurs ciblant différents acteurs de ces voies (**Figure I.10**). Les résultats sont repris sous forme de tableau (**Tableau III.3**).

Bien que ces résultats doivent être confirmés par d'autres hybridations complémentaires et des validations par RT-PCR en temps réel, la première chose qui ressort de l'analyse est que le LY294002 inhibe l'expression de plusieurs gènes, comme nous l'avons observé pour le BAY 11-7082.

Effectivement, nous remarquons une diminution de l'expression des gènes codant pour des cytokines, comme l'IL-10, certaines chémokines, telles que le facteur MCP-1, MCP-3 et RANTES, divers marqueurs d'inflammation comme des facteurs de croissance et de différenciation, tels que le CSF2 et le CSF3, ainsi que le MMP9 et son inhibiteur le TIMP1, la serpine-1, la GCH, la protéine BCL3, et les protéines de la famille de MAPKKs et la JAK2.

Des effets similaires ont été observés par l'équipe de Kim. Ils montrent, par RT-PCR en temps réel que le LY294002 exerce des effets semblables à celui du TGF- β , cytokine plutôt anti-inflammatoire. Ces deux molécules provoquent une répression des gènes codant pour le TNF- α , l'IL-6 et la MMP9, surexprimés en présence de LPS (Kim et al. 2004).

De plus, une équipe a montré récemment l'importance de la voie de la PI3K dans la régulation de la production d'IL-10 due à une stimulation au LPS. Ces auteurs soulignaient dès lors l'intervention de la voie PI3K/Akt dans la régulation négative de l'activation des processus inflammatoires par le LPS (Peng et al. 2006).

Les différences majeures par rapport au BAY 11-7082, sont l'effet inhibiteur sur l'expression de MMP9 (nous avons observé une surexpression avec le BAY-117082), sur l'expression de l'IL-6 (pas d'effet avec le BAY 11-7082), et sur l'expression de GCH (pas d'effet avec le BAY 11-7082). Enfin, contrairement au BAY 11-7082, le LY 294002 ne semble pas affecter l'expression de l'IL-1 β . Le LY294002 montre donc des effets qui lui sont spécifiques. Nous observons notamment que l'expression du gène codant pour la GTP cyclohydrolase 1 (GCH) est fortement réprimée lors de la pré-incubation avec le LY94002 des cellules RAW 264.7 stimulées au LPS. Des études avaient déjà démontré la surexpression de ce gène lors de l'incubation de cellules en présence de LPS (Kaneko et al. 2001). La GCH est une enzyme limitante dans la biosynthèse de la tétrahydrobioptérine (BH₄), cofacteur de différentes enzymes, synthétisant entre autres des catécholamines, mais il s'agit aussi d'un cofacteur de la iNOS. Or, nous montrons une augmentation de l'expression du gène au niveau ARNm avec le LPS dans les macrophages murins et une répression de ce gène lors de l'administration du LY294002. L'équipe de Hattori (1995) a également corrélé la surexpression des ARNm de GCH dans différents tissus, avec celle des ARNm pour l'iNOS. Dans nos résultats, nous montrons d'ailleurs que le LY294002 diminue le taux de transcrits de iNOS (Hattori et al. 1995).

2.6.3.2 Gènes dont l'expression varie en présence de wortmannine.

Parmi les gènes étudiés, nous observons deux tendances principales : d'une part ceux sur lesquels la wortmannine exerce une répression de l'expression de ces gènes et d'autre part les gènes surexprimés en présence de wortmannine (**Tableau III.3**).

Les gènes codant pour l'IL-1 α , la chémokine MCP-3, le MCP-1, le facteur CSF3, et la JNKK2 sont réprimés par la wortmannine. En parallèle, l'expression génique des gènes encodant le MMP9, l'iNOS, l'ENG, la GCH ainsi que des protéines kinases, JNKK1 et JAK2 augmente en présence de wortmannine. Parmi les gènes dont l'expression est augmentée en présence de wortmannine, nous retrouvons donc de nouveau le gène codant pour la GCH déjà évoqué précédemment (Kaneko et al. 2001).

Par contre, on observe des discordances lorsqu'on compare le LY294002 et la wortmannine pour les gènes encodant l'IL-1 α , l'IL-10, l'IL-6, RANTES, CSF2, MMP9, TIMP1, iNOS, serpine-1, GCH, ENG, BCL-3 et les kinases JNKK1 et JAK2.

Nous nous sommes particulièrement intéressés aux gènes pour lesquels nous observons des effets opposés du LY294002 et de la wortmannine, bien qu'étant tous les deux des inhibiteurs de la PI3K, car plusieurs données expérimentales rapportent des effets contraires du LY294002 et de la wortmannine (Kim et al. 2005; Hazeki et al. 2006).

Ces effets ont été particulièrement bien étudiés dans le cadre de la régulation de l'expression et de l'activité de l'iNOS. L'équipe de Hazeki (2006) a montré que la surexpression d'iNOS par le LPS était contrée par le LY294002, mais augmentée avec la wortmannine. Ils ont alors utilisé des dominants négatifs et des siRNA contre p110 (sous-unité catalytique de PI3K) qui montraient les mêmes effets que la wortmannine. Ils ont également noté que ces deux inhibiteurs bloquent la phosphorylation d'Akt médiée par la PI3K et augmentent la dégradation d'I κ B.

Des résultats similaires ont été obtenus lors de l'étude de la production de TNF et de NO (Park et al. 1997). Cependant, nos résultats obtenus sur l'expression de TNF- α ne sont pas concordants avec ce qui a été observé dans la littérature.

2.6.3.3 Gènes dont l'expression est régulée par la rapamycine.

La rapamycine a clairement des effets sur l'expression de certains gènes induits pas le LPS.

Nous remarquons que les gènes codant pour le MCP-1, le MCP-3, le CSF2 ainsi que le CSF3, BCL-3, JNKK2 semblent réprimés lors du traitement des macrophages murins RAW 264.7 à la rapamycine (**Tableau III.3**).

En parallèle, nous observons que l'expression les gènes codant pour l'IL-1 β , le MMP9, l'iNOS, JNKK1, et JAK2 augmente nettement en présence de rapamycine. Cette augmentation de l'expression génique est concordante avec les effets de la rapamycine sur l'activation du facteur NF- κ B. On observe aussi un parallélisme partiel entre wortmannine et rapamycine, qui mériterait d'être approfondi dans des expériences futures.

En attendant, nous avons essayé de confronter nos résultats avec les données de la littérature. Potter et al. ont mis en évidence une induction de la phosphorylation directe de 4E-BP1 lors de la stimulation de RAW 264.7 en présence de LPS (Potter et al. 2001). L'activation de la phosphorylation de cette protéine est mTOR dépendante, car l'inhibition de cette enzyme prévient la phosphorylation de 4E-BP1 (Potter et al. 2001).

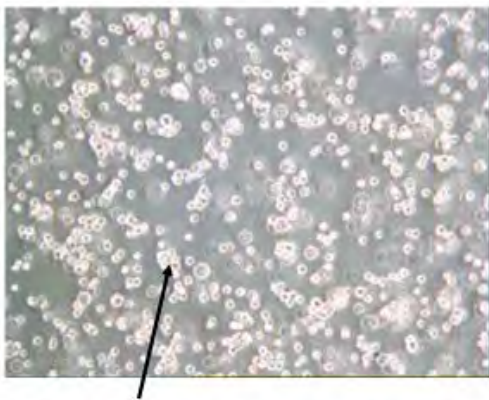
D'autres études soulignent l'importance des différents complexes moléculaires pouvant interagir avec mTOR, régulant aussi sa sensibilité vis-à-vis de la rapamycine. En effet, Kristof et son équipe (2003) ont démontré que le complexe mTOR/STAT1 (Signal Transducer and Activator of Transcription-1) était insensible à une exposition à la rapamycine et que celui-ci est impliqué dans la réponse cellulaire à une stimulation en présence de LPS et d'IFN- γ . L'activation de ce complexe entrainerait dès lors l'activation de la transcription de gènes étant sous le contrôle de STAT1, dont des gènes pro-apoptotiques et intervenant dans des processus inflammatoires (Adi et al. 2001).

D'autres études menées sur les RAW 264.7 stimulées au LPS montrent qu'une stimulation de ces cellules en présence de 25 μ M de LY294002 et de 60 nM de rapamycine bloque complètement l'activation de la p70/S6K (Salh et al. 1998). Cela suggère donc une activation directe de cette voie mTOR/FRAP lors de la liaison du LPS au TLR4. Cependant, les mécanismes précis, ainsi que tous les acteurs en jeu lors de cette activation ne sont pas connus à ce jour

Par ailleurs, l'équipe de Minhajuddin (2005) a montré sur des cellules endothéliales en culture (HUVECs) prétraitées avec la rapamycine, et stimulées ensuite à la thrombine, une augmentation de l'abondance d'ICAM-1 au niveau protéique via la voie NF- κ B (Minhajuddin et al. 2005). D'après ces auteurs, il semblerait que, lorsque mTOR est inhibé par la rapamycine, IKK s'active, induisant dès lors la phosphorylation d'I κ B. Ils ont observé un taux de phosphorylation élevé d'I κ B, provoquant dès lors sa dégradation et la translocation de RelA/p65 dans le noyau, permettant l'activation de la transcription de gènes sous le contrôle de NF- κ B. Ces données suggèrent que mTOR régule négativement la surexpression du gène codant pour l'ICAM-1 dans les cellules endothéliales stimulées à la thrombine, en régulant négativement l'activation de NF- κ B.

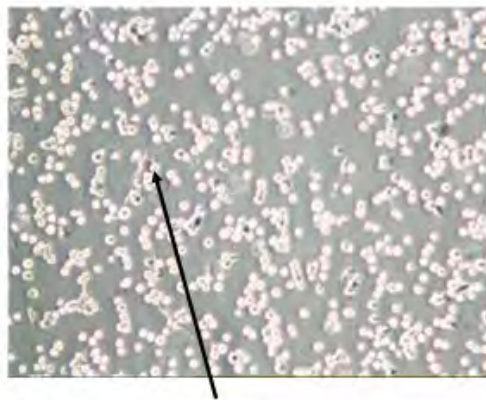
Ce mécanisme permettrait d'expliquer la surexpression observée avec la rapamycine pour les gènes encodant, l'IL-1 β , MMP9, iNOS, JNKK1 et JAK2. L'une des perspectives immédiates de ce travail sera donc de vérifier cette hypothèse et de démontrer par quels mécanismes la voie NF- κ B est activée dans ces conditions.

THP-1 - CTL



Cellules en suspension formant des grappes

THP-1 + PMA



Cellules adhérentes avec des prolongements cytoplasmiques

Figure III.1: Photographies en microscopie à contraste de phase de monocytes THP-1 en suspension, avant différenciation (à gauche) et après différenciation en macrophages avec le PMA (à droite). Nous observons que les monocytes en suspension forment des grappes ; après traitement au PMA, on observe des pseudopodes et les cellules tendent à adhérer au fond des boîtes de culture (objectif 20 X).

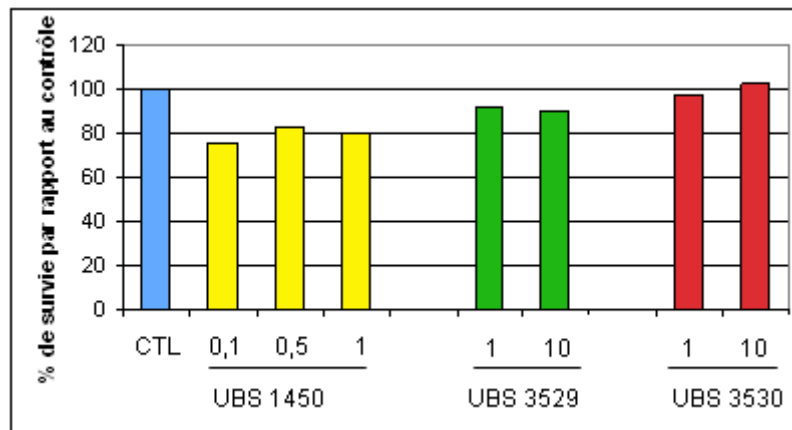


Figure III. 2: Evaluation de la cytotoxicité après 6 heures de stimulation des monocytes THP-1 en présence des cardénolides fournis par la firme Unibioscreen, l'UBS 1450, l'UBS 3529, et l'UBS 3530, par un test MTT. Les concentrations testées sont exprimées en μM . La survie cellulaire est exprimée en pourcentage par rapport au contrôle (100 %). Les conditions de stimulation sont rapportées sur l'axe des abscisses (μM).

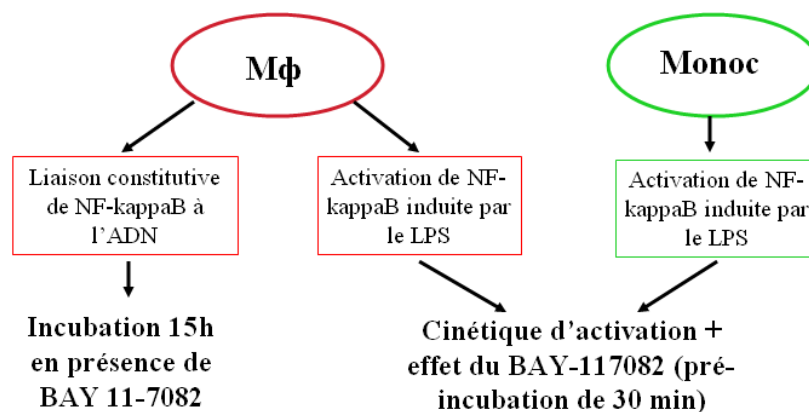


Figure III.3 : Représentation schématique des modèles cellulaires utilisés en monocytes/macrophage THP-1 pour tester un inhibiteur de référence de la voie NF- κB , ici le BAY 11-7082, à une concentration de 25 μM .

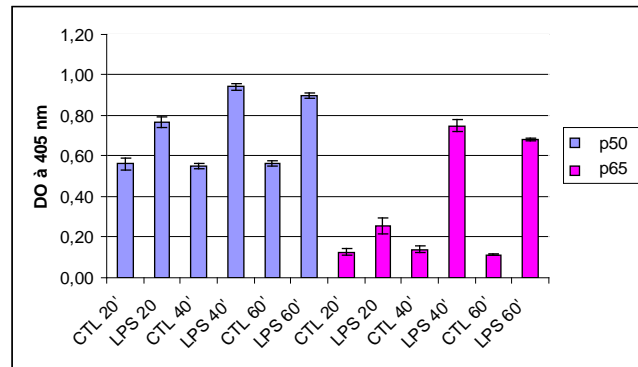


Figure III. 4: Effet du LPS sur l'activité de liaison à l'ADN de NF- κ B, extrait à partir de macrophages THP-1 (différenciés au PMA 0,6 μ M), stimulés 20, 40 et 60 minutes en présence de LPS 100 ng/ml. L'activité de liaison est évaluée par un test Trans-AM® (voir point 2.3.3. des Matériels et méthodes) avec soit un anticorps contre p50, soit un anticorps contre p65. Les résultats sont exprimés en absorbance à 405 nm (moyenne de 3 valeurs \pm écart-type). Les conditions de stimulation sont rapportées sur l'axe des abscisses.

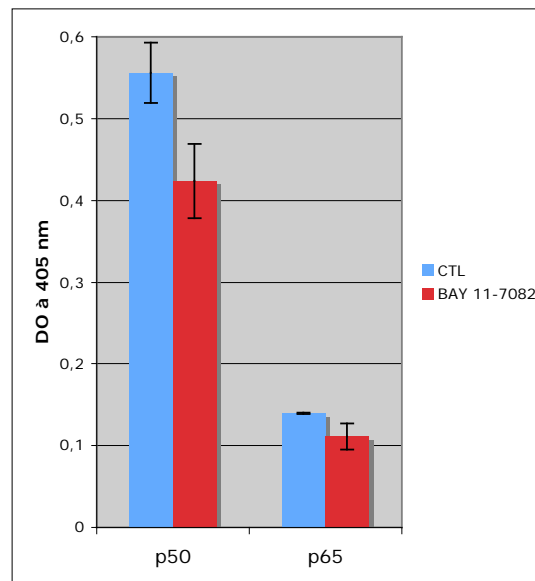


Figure III.5 : Effet du BAY 11-7082 sur l'activité de liaison à l'ADN de NF- κ B provenant d'échantillons de protéines nucléaires de macrophages THP-1 incubés 15 heures en présence de BAY 11-7082 à une concentration de 25 μ M. L'activité de liaison est évaluée par un test Trans-AM® (voir point 2.3.3. des Matériels et méthodes) avec soit un anticorps contre p50, soit un anticorps contre p65. Les résultats sont exprimés en absorbance à 405 nm (moyenne de 3 valeurs \pm écart-type). Les conditions de stimulation sont rapportées sur l'axe des abscisses.

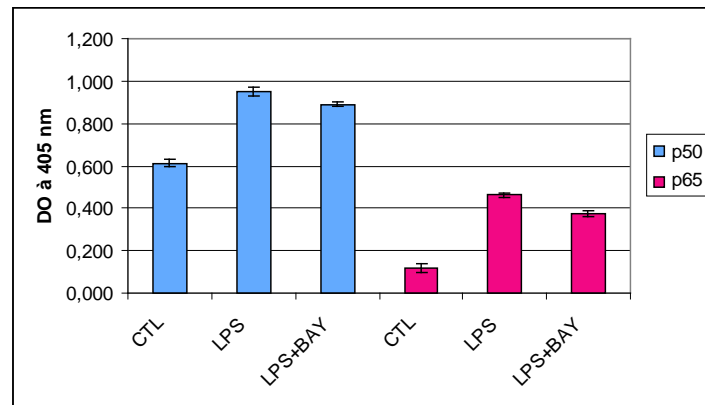


Figure III.6 : Effet du BAY 11-7082 (25 μ M) sur l'activité de liaison à l'ADN de NF- κ B, à partir de protéines nucléaires, extraites de macrophages THP-1 préincubés 30 minutes en présence de BAY 11-7082 25 μ M, puis stimulés 40 minutes en présence de LPS 100 ng/ml. L'activité de liaison est évaluée par un test Trans-AM® (voir point 2.3.3. des Matériels et méthodes) avec soit un anticorps contre p50, soit un anticorps contre p65. Les résultats sont exprimés en absorbance à 405 nm (moyenne de 3 valeurs \pm écart-type). Les conditions de stimulation sont rapportées sur l'axe des abscisses.

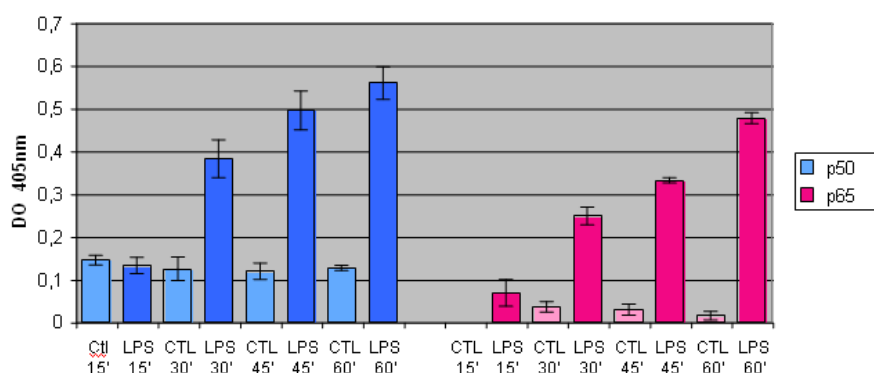


Figure III. 7: Effet du LPS 100 ng/ml sur l'activité de liaison à l'ADN de NF- κ B, à partir de protéines nucléaires extraites de monocytes THP-1. Une cinétique de temps a été effectuée, de 15 à 60 minutes. L'activité de liaison est évaluée par un test Trans-AM® (voir point 2.3.3. des Matériels et méthodes) avec soit un anticorps contre p50, soit un anticorps contre p65. Les résultats sont exprimés en absorbance à 405 nm (moyenne de 3 valeurs \pm écart-type). Les conditions de stimulation sont rapportées sur l'axe des abscisses.

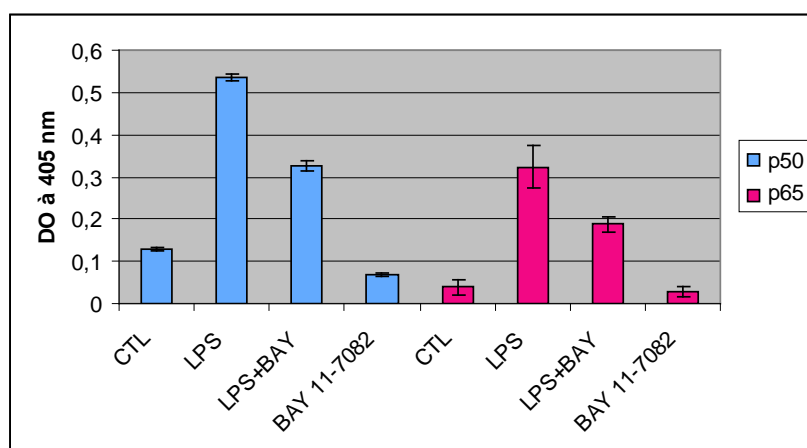


Figure III. 8: Effet du BAY 11-7082 sur l'activité de liaison à l'ADN de NF- κ B, à partir de protéines nucléaires de monocytes THP-1, préincubés 30 minutes en présence de 25 μ M de BAY 11-7082, stimulés ensuite 45 minutes en présence de LPS 100 ng/ml. L'activité de liaison est évaluée par un test Trans-AM® (voir point 2.3.3. des Matériels et méthodes) avec soit un anticorps contre p50, soit un anticorps contre p65. Les résultats sont exprimés en absorbance à 405 nm (moyenne de 3 valeurs \pm écart-type).. Les conditions de stimulation sont rapportées sur l'axe des abscisses.

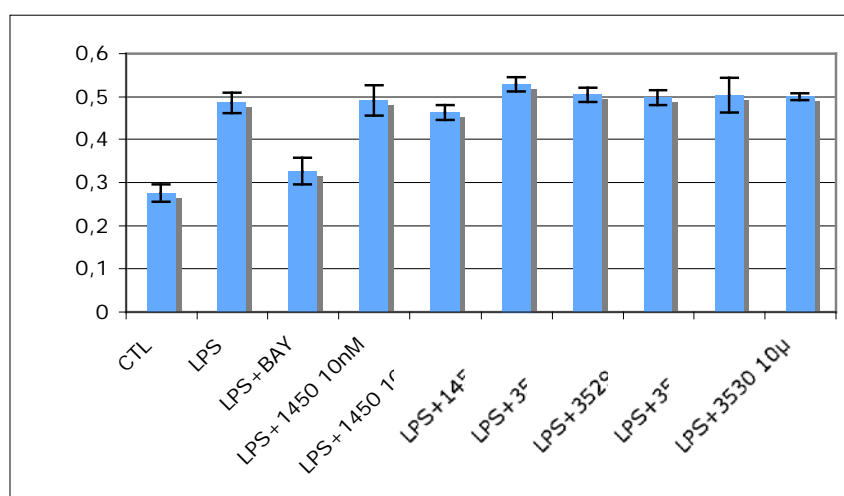


Figure III.9: Effets des cardénolides et du BAY 11-7082 sur l'activité de liaison à l'ADN de NF- κ B extrait de monocytes THP-1 préincubés 30 minutes en présence des inhibiteurs, stimulés ensuite 45 minutes en présence de LPS à 100 ng/ml. Les concentrations testées en inhibiteurs étaient de : 25 μ M pour le BAY 11-7082, 10 et 100 nM ainsi que 1 μ M pour l'UBS 1450, 1 et 10 μ M pour l'UBS 3529 et 3530. L'activité de liaison est évaluée par un test Trans-AM® (voir point 2.3.3. des Matériels et méthodes) avec un anticorps contre p65. Les résultats sont exprimés en absorbance à 405 nm (moyenne de 3 valeurs \pm écart-type). Les conditions de stimulation sont rapportées sur l'axe des abscisses.

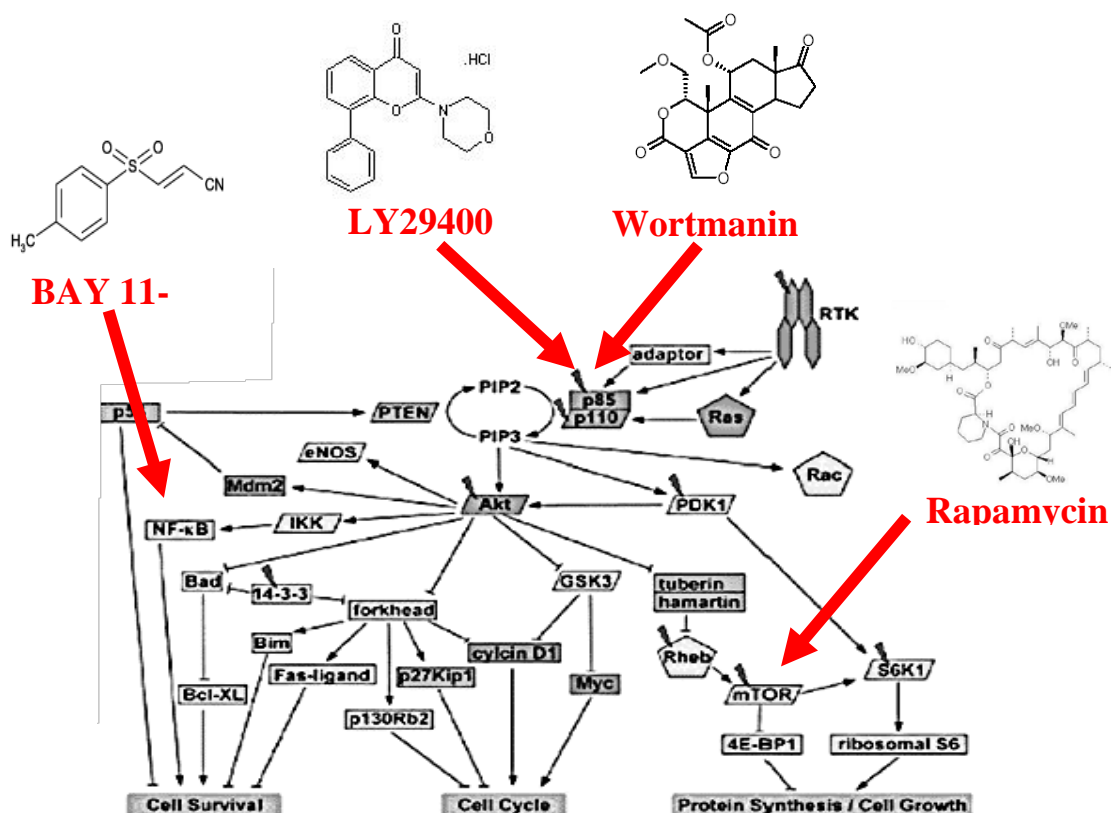


Figure III. 10 Schéma illustrant les sites d'action des inhibiteurs chimiques utilisés dans ce travail.

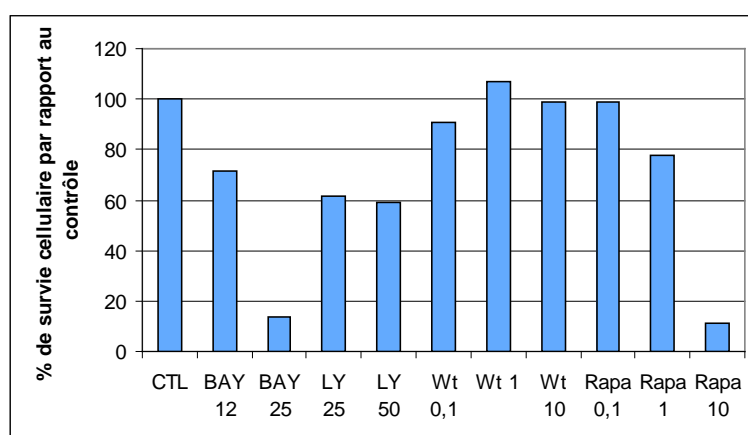


Figure III.11: Effets des différents inhibiteurs sur la survie cellulaire de RAW 264.7 stimulés 6 heures, en présence des différents inhibiteurs, le BAY 11-7082 (BAY), le LY294002 (LY), la wortmannine (Wt), et la rapamycine (Rapa), à différentes concentrations (en μM). La survie cellulaire a été estimée à l'aide d'un test colorimétrique MTT, donnant une valeur d'absorbance à 570 nm. La survie a été exprimée en pourcentage par rapport aux cellules non traitées (CTL). Les conditions de stimulation sont rapportées sur l'axe des abscisses.

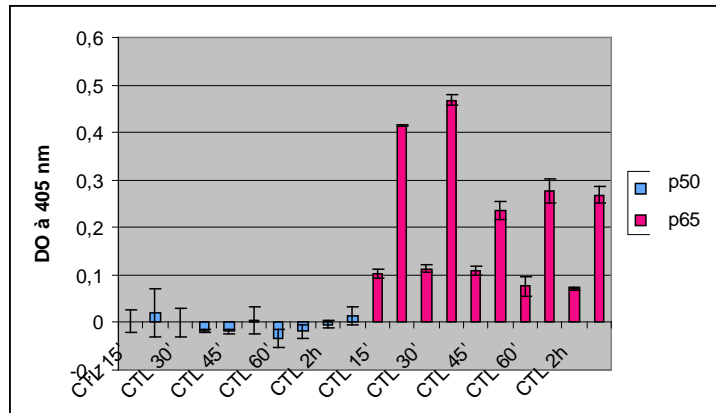


Figure III. 12: Effet du LPS sur l'activité de liaison de NF-κB à l'ADN, à partir d'extraits de protéines nucléaires (5 µg) de cellules RAW 264.7 stimulées au LPS 100 ng/ml. Stimulations de 15, 30, 45, 60 minutes et 2 heures en présence de LPS. L'activité de liaison est évaluée par un test Trans-AM® (voir point 2.3.3. des Matériels et méthodes) avec soit un anticorps contre p50, soit un anticorps contre p65. Les résultats sont exprimés en absorbance à 405 nm (moyenne de 3 valeurs ± écart-type).. Les conditions de stimulation sont rapportées sur l'axe des abscisses.

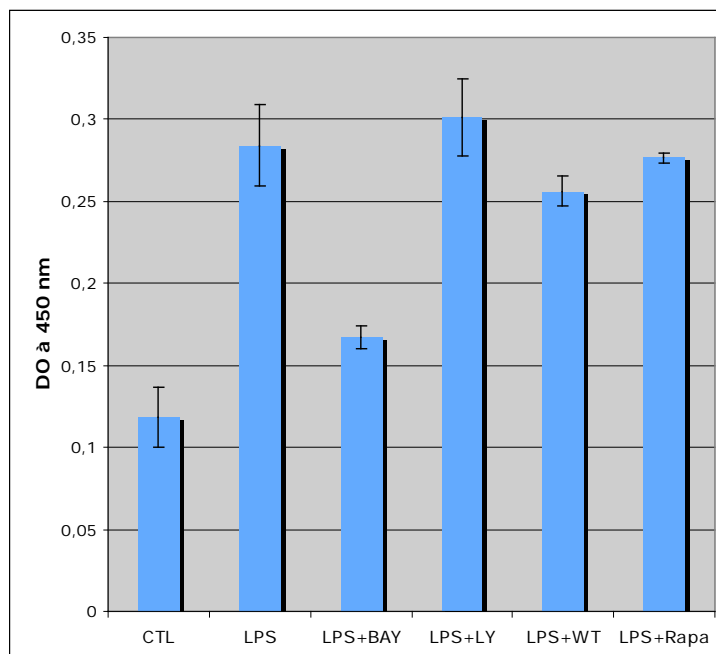


Figure III.13: Effets des inhibiteurs sur l'activité de liaison à l'ADN de NF-κB, à partir d'extraits de protéines nucléaires de cellules préincubées en présence des inhibiteurs (BAY 11-7082 12 µM (BAY), LY294002 25 µM (LY), wortmannine 1 µM (WT), Rapamycine 1 µM (Rapa)), stimulées ensuite 30 minutes en présence de LPS 100 ng/ml. L'activité de liaison est évaluée par un test Trans-AM® (voir point 2.3.3. des matériels et méthodes) avec un anticorps contre p65. Les résultats sont exprimés en absorbance à 405 nm (moyenne de 3 valeurs ± écart-type). Les conditions de stimulation sont rapportées sur l'axe des abscisses.

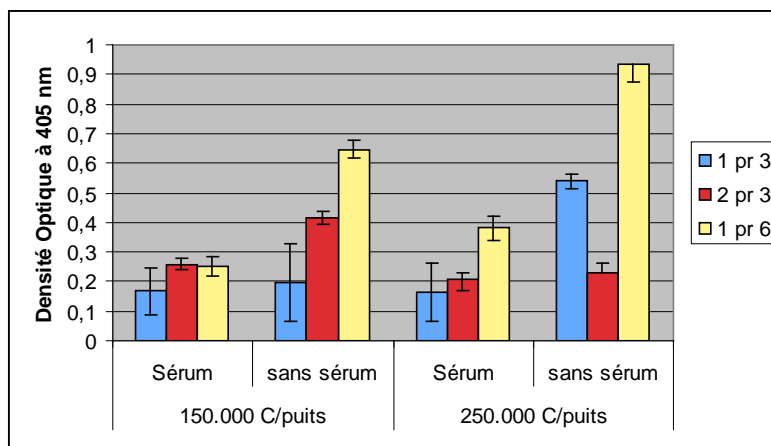


Figure III.14: Activité de la β -Galactosidase de cellules RAW 264.7 transfectées avec un plasmide pCVM- β Gal à l'aide du FuGène6. La transfection a été testée sur deux densités cellulaires, avec ou sans sérum, à des rapports « ADN – FuGène 6 » de 1:3, 2:3 et 1:6 (μ g d'ADN pour μ g de FuGène 6). Moyenne de 3 valeurs \pm écart-type. Les conditions de stimulation sont rapportées sur l'axe des abscisses.

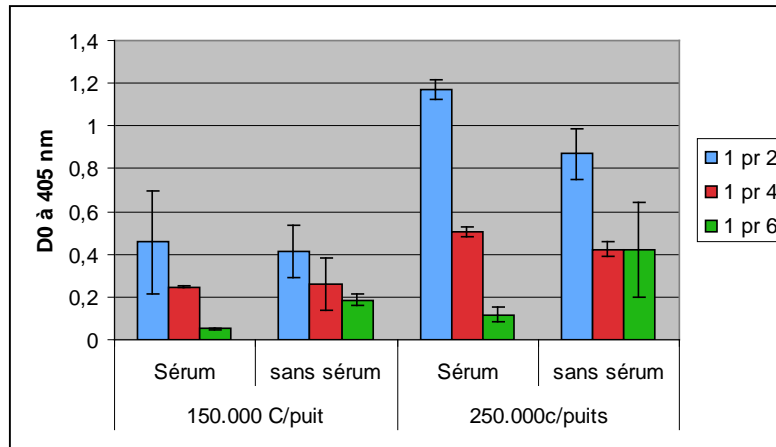


Figure III.15 : Activité e de la β -Galactosidase de cellules RAW 264.7 transfectées avec un plasmide pCVM- β Gal à l'aide du Superfect. La transfection a été testée sur 2 densités cellulaires, avec ou sans sérum, à des rapports « ADN – Superfect » de 1:2, 1:4 et 1:6 (μ g d'ADN pour μ g de Superfect). Moyenne de 3 valeurs \pm écart-type. Les conditions de stimulation sont rapportées sur l'axe des abscisses.

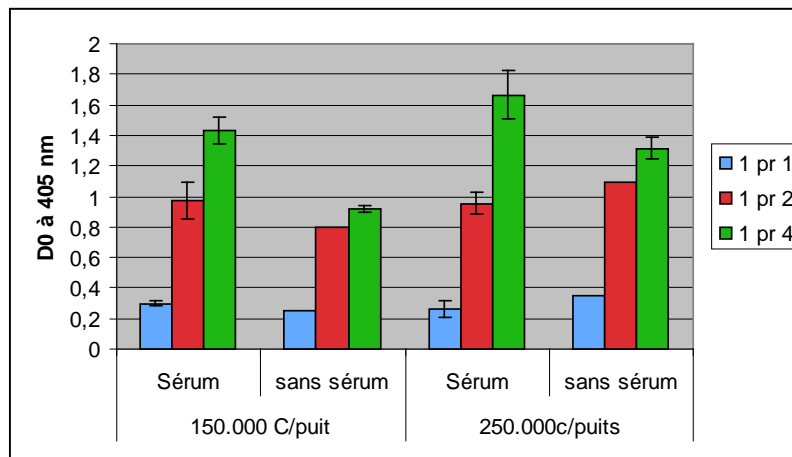


Figure III. 16: Activité de la β -Galactosidase de cellules RAW 264.7 transfectées avec un plasmide pCVM- β Gal à l'aide de la Lipofectamine 2000. La transfection a été testée sur 2 densités cellulaires, avec ou sans sérum, à des rapports « ADN – Lipofectamine 2000 » de 1:1, 1:2 et 1:4 (μ g d'ADN pour μ g de Lipofectamine 2000). Moyenne de 3 valeurs \pm écart-type. Les conditions de stimulation sont rapportées sur l'axe des abscisses.

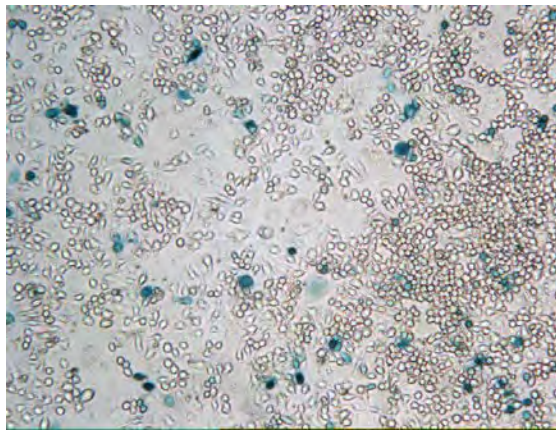


Figure III. 17: Evaluation de l'efficacité de transfection de cellules RAW 264.7 transfectées avec le PCMV- β -Gal, à l'aide de la Lipofectamine 2000, en présence de sérum, et avec un rapport « ADN – Lipofectamine 2000 » 1:4. Les cellules bleues sont celles exprimant la β -Gal. On remarque que certaines cellules sont plus colorées que d'autres. Il se peut donc que certaines cellules aient incorporé un ou plusieurs plasmides, donnant donc une coloration variable au sein de la population cellulaire. Micrographie à contraste de phase (Objectif 20 X).

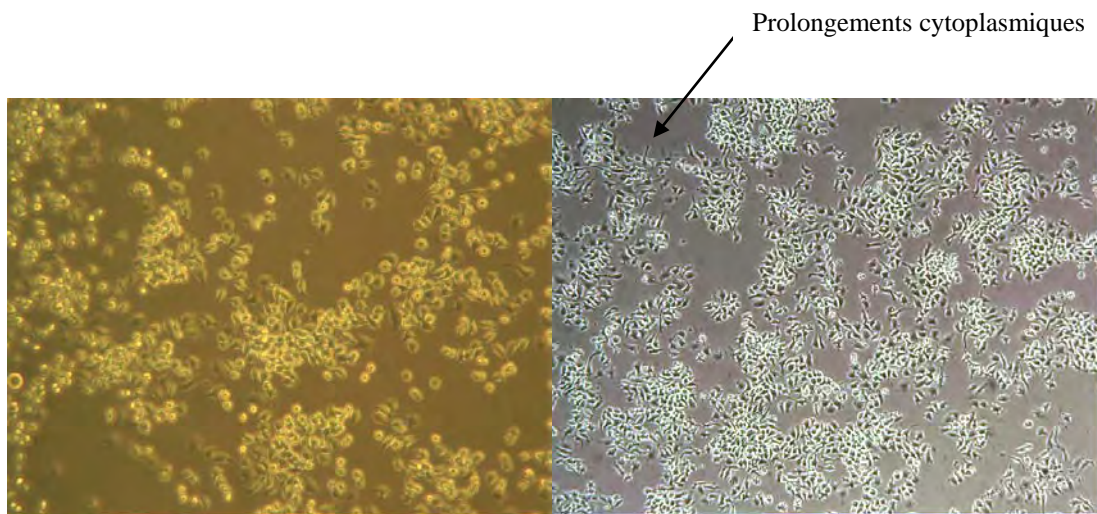


Figure III.18 : Micrographie en contraste de phase de cellules RAW 264.7 transfectées à la Lipofectamine 2000 1:4, en présence de sérum, à 150.000 cellules par puits. Cette photo a été prise le lendemain de la transfection, après récupération des cellules pendant une nuit, en présence de milieu de culture à 10 % de sérum (Objectif 20 X).

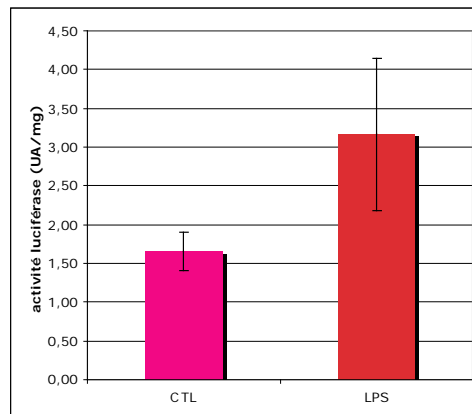


Figure III. 19: Effet du LPS sur l'activité luciférase rapportée à la quantité de protéines totales de macrophages murins RAW 264.7 transfectés à la Lipofectamine 2000 avec un plasmide pNF- κ B-Luc et stimulées avec du LPS à 10 ng/ml pendant une nuit. L'activité luciférase a été exprimée en unités arbitraires (UA) par mg de protéines. Les valeurs correspondent à la moyenne de trois valeurs \pm écart-type. Les conditions de stimulation sont rapportées sur l'axe des abscisses.

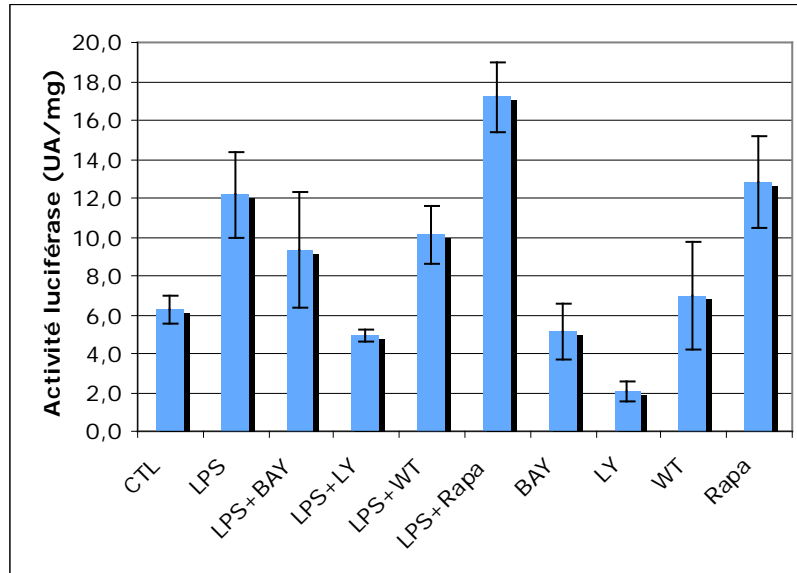


Figure III. 20: Effets des inhibiteurs sur l'activité transactivatrice de NF- κ B dans des cellules RAW 264.7 stimulées en présence de LPS 10 ng/ml. L'activité luciférase est exprimée en unités arbitraires (UA) de luciférase rapportées à la quantité de protéines. Les cellules ont été transfectées à la Lipofectamine 2000 (1:4) en présence de sérum, pour une densité cellulaire de 150.000 cellules par puits. Les cellules transfectées ont ensuite été préincubées une heure en présence des inhibiteurs seulement (BAY 11-7082 12 μ M (BAY), LY294002 25 μ M (LY), wortmannine 1 μ M (WT), rapamycine 1 μ M (Rapa)). Après cette heure de préincubation, les cellules sont stimulées en présence de LPS à 10 ng/ml. Les conditions de stimulation sont rapportées sur l'axe des abscisses.

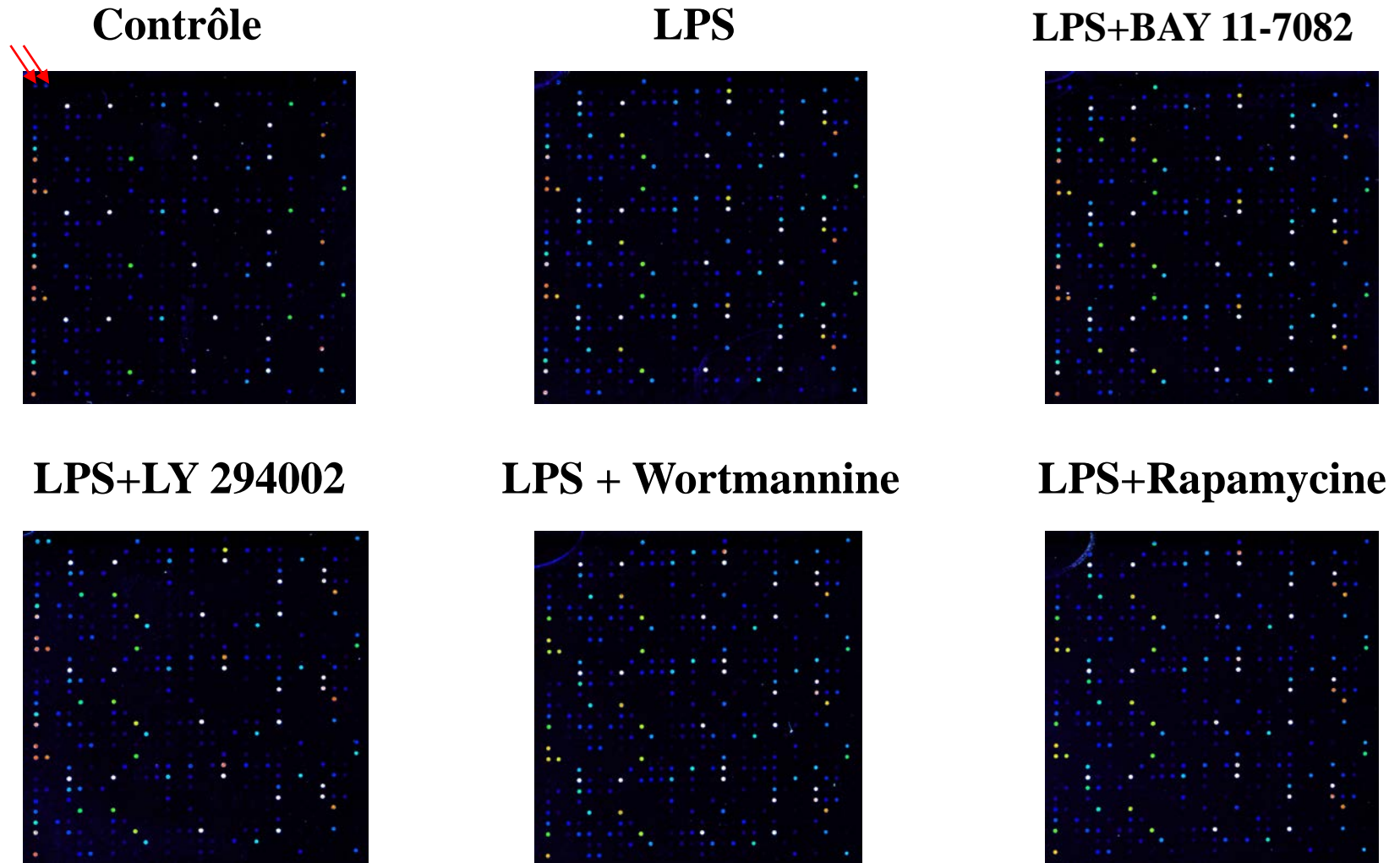
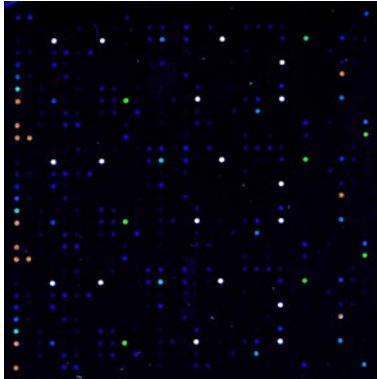
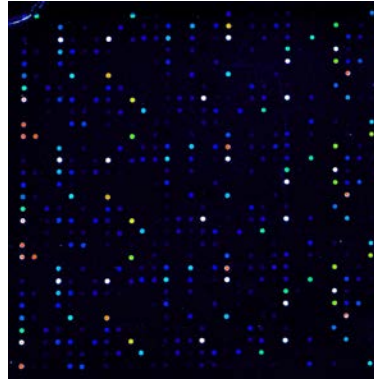


Figure III.21a: Images prises au scanner confocal à fluorescence des damiers à ADN DualChip® Mouse Inflammation, issus de l'hybridation d'ADNc provenant d'ARNm de macrophages murins RAW 264.7, pré-incubés une heure en présence des inhibiteurs (12 μ M de BAY 11-7082, 25 μ M de LY294002, 1 μ M de Wortmannine et 1 μ M de Rapamycine), stimulés ensuite 6 heures en présence de LPS 100 ng/ml (réplicat n°1). Les damiers à ADN sont scannés au microscope à fluorescence à trois gains, 100, 70 et 50, correspondant à l'ouverture du diaphragme du photomultiplicateur. Les images représentées ici correspondent au gain 70. Les flèches rouges indiquent des contrôles positifs d'hybridation.

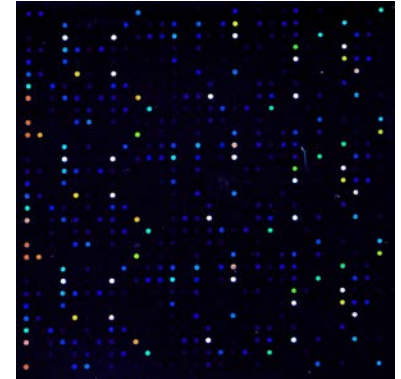
Contrôle



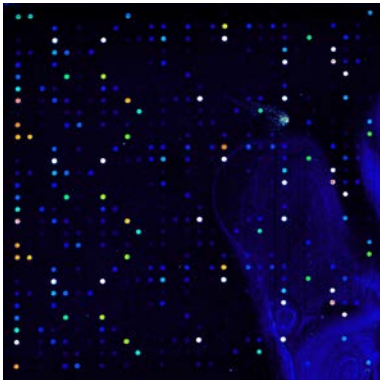
LPS



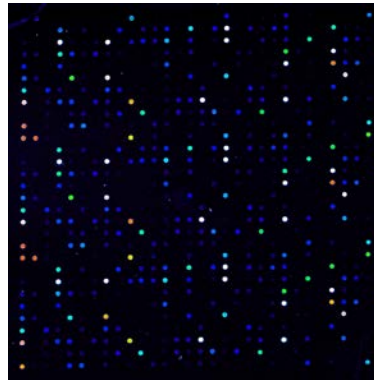
LPS + BAY 11-7082



LPS + LY 294002



LPS + Wortmannine



LPS + Rapamycine

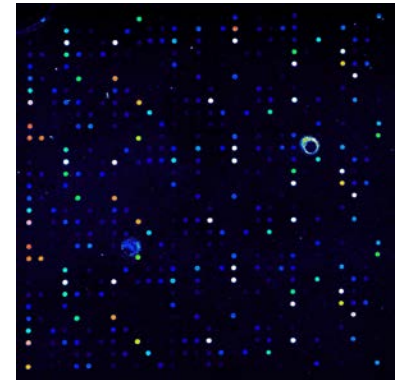


Figure III. 21a: Images prises au scanner confocal à fluorescence des damiers à ADN DualChip® Mouse Inflammation, issus de l'hybridation d'ADNc provenant d'ARNm de macrophages murins RAW 264.7, préincubés une heure en présence des inhibiteurs (12 μ M de BAY 11-7082, 25 μ M de LY294002, 1 μ M de Wortmannine et 1 μ M de Rapamycine), stimulés ensuite 6 heures en présence de LPS 100 ng/ml (Réplicat n°2). Les images représentées correspondent au gain 70.

Nom du gène	Fold d'induction
CASP1	2,2
TGFB1	2,05
GCH	2
TNFRSF1A	2,08
MAP2K1	1,95
MAP2K4	2,22
ENG	2,04
BCL3	12,67
MAP2K7	3,03
IL18	1,31
IRF7	3,14
MX1	6,24
TRAF 1	4,95
NFKB1	4,16
JAK2	6,9
FOSL2	8,52
PDGFB	5,27
TNF	9,68
NFKBia	10,2
TNFRSF5	11
CSF2RA	1,9

Tableau III. 1: Liste de gènes dont l'expression varie de façon positive en réponse à une stimulation au LPS (100 ng/ml) de 6 heures, avec des facteurs d'induction (« fold induction ») quantitatifs.

Nom du gène	Fold d'induction
MAP3K8	++
C3	+
SAA1	++
TNFAIP3	++
SERPINE 1	++
TIMP1	++++
MYC	++
TNFRSF1B	+++
TNFRSF6	++
CCL5	++++
IL1RN	+++
CCL7	++++
CSF2	++++
IL1B	++++
CSF3	+++++
CCL2	+++
CCL3	++
IL-10	+++++
IL-1 α	+++++
IL-6	+++++
MMP9	++++
NO2	++++

Tableau III. 2: Liste de gènes dont l'expression varie de façon positive en réponse à une stimulation au LPS (100 ng/ml) de 6 heures, et pour lesquelles les facteurs d'induction sont qualitatifs.
(1<+<9, 10<++<99, 100<+++<999, 1000<++++<9999, 10000<+++++<99999)

Catégories de gènes	Liste de gènes	Ratios LPS/CTL	Ratios « LPS+BAY /CTL »	Ratios « LPS+LY/CTL »	Ratios « LPS+WT/CTL »	Ratios « LPS+Rapa/CTL »
Cytokines	TNF- α	9,68	17,66	12,93	10,28	11,87
	IL-1 α	+++++	+++++	+++++	++++	+++++
	IL-1 β	++++	+++	++++	++++	+++++
	IL-10	+++++	++++	Pas d'expression	+++++	+++++
	IL-6	+++++	+++++	++++	+++++	+++++
Chémokines	MIP-1 α	++	++	39,44	49,56	46,1
	MCP-1	+++	++	28,2	115,59	79,52
	MCP-3	++++	+++	+	+++	+++
	RANTES	++++	+++	+++	++++	++++
Marqueurs d'inflammation	CSF2	++++	+++	++	++++	+++
	CSF3	+++++	+++++	++++	++++	++++
	MMP9	+++	++++	+++	++++	++++
	TIMP1	++++	+++	+++	++++	++++
	iNOS	++++	+++	++++	+++++	+++++
	COX2	+++	++++	+++	+++	+++
	C3	+	++	+	+	+
	Serpine-1	++	+	+	++	++
	GCH	2	2	-5,23	2,49	1,63
Autres	ENG	2,04	1,19	1,18	3,01	1,85
	BCL-3	12,67	5,69	3,86	11,84	10,65
Acteurs de voies de transduction du signal	JNKK1	2,22	2,41	1,34	4,2	3,32
	JNKK2	3,03	1,33	1,33	-1,29	1,2
	JAK2	6,9	5,59	5,36	9,89	9,16

Tableau III.3 : Tableau reprenant les ratios quantitatifs et qualitatifs de quelques surexprimés avec le LPS, et effets des différents inhibiteurs des voies NF- κ B, et PI3K sur les profils d'expression génique observé.

4. Conclusions et Perspectives

Conclusions et perspectives

L'objectif de ce mémoire a été d'améliorer nos connaissances quant à la réponse cellulaire de monocytes/macrophages stimulés en présence d'un agent bactérien très répandu, le lipopolysaccharide. Ces travaux s'effectuent dans le cadre d'un programme de recherche fondamentale mené en U.R.B.C. dans le contexte de l'athérosclérose, maladie inflammatoire chronique. En effet, on reconnaît à cette pathologie une composante inflammatoire, des cellules du système immunitaire inné, tels les monocytes/macrophages, intervenant très tôt dans et participant au développement des lésions athéromateuses. Dans ce contexte, ce mémoire a été consacré plus particulièrement à l'étude des mécanismes moléculaires des réponses cellulaires de monocytes/macrophages à une molécule pro-inflammatoire, le LPS. Le LPS, via le récepteur TLR4 et protéines associées, déclenche des voies de signalisation complexes, mais où le facteur NF- κ B joue un rôle central. On peut donc comprendre que ce facteur de transcription, qui régule étroitement l'expression de nombreux gènes impliqués dans la réponse inflammatoire, soit une cible privilégiée pour des approches thérapeutiques.

Dans la première partie de ce mémoire, en collaboration avec Unibioscreen, nous avons tenté d'évaluer les propriétés anti-NF- κ B de trois cardénolides. Unibioscreen sur base de données préliminaires, espère identifier dans cette famille de cardénolides, des molécules anti-inflammatoires à destinée thérapeutique. Les résultats préliminaires suggèrent que certains de ces composés auraient une activité anti-NF- κ B, démontrée dans une lignée de carcinome humain. Nous les avons donc testés dans un modèle cellulaire plus relevant, le modèle des monocytes/macrophages THP-1, et dans un premier temps les cardénolides ont été testés sur l'activité de liaison à l'ADN de NF- κ B ainsi que sur son activité transactivatrice. Nous ne sommes pas parvenus à démontrer des effets anti-NF- κ B des cardénolides UBS 1450, UBS 3529 et UBS 3530 sur l'activation induite en présence de LPS de ce facteur de transcription dans le modèle de monocytes/macrophages humains THP-1 utilisé dans ce mémoire. Une contamination aux mycoplasmes au sein du laboratoire a mis fin prématurément à ce travail, mais le but de ce projet était d'analyser les effets anti-inflammatoires des cardénolides via les profils d'expression génique de cellules inflammatoires humaines obtenus avec le damier DualChip® Human Inflammation commercialisé par Eppendorf. Une des perspectives directes de ce travail est donc de confirmer les effets anti-NF- κ B, d'un ou plusieurs cardénolides, en se focalisant plus sur les activités constitutives de NF- κ B et dans l'affirmative d'utiliser le damier DualChip Human Inflammation, pour préciser les gènes cibles des cardénolides.

Dans la deuxième partie du mémoire, nous avons tenté de décortiquer les rôles respectifs de voies de transduction du signal activées par le LPS : les voies menant à l'activation des protéines NF- κ B, la voie PI3K/Akt et mTOR, et ce dans un modèle de macrophages murins.

Le LPS induit, chez les monocytes/macrophages une réponse typiquement inflammatoire, comme il a déjà été décrit dans la littérature (Sweet and Hume 1996; Guha and Mackman 2001; Hashimoto et al. 2003).

Dans le cadre de ce travail, nous avons utilisé la Dualchip® Mouse Inflammation, un damier à ADN qui permet de suivre l'expression de 233 gènes encodant des protéines impliquées dans les réponses inflammatoires. Dans notre modèle de macrophages murins RAW264.7, nous observons bien une surexpression des gènes codant pour

- des cytokines (IL-6, IL-1 α et IL-1 β , TNF) et des chémokines (MCP-1, MIP-1 α , ...)

- des protéines impliquées dans des voies de transduction du signal dont on sait qu'elles sont interconnectées à la voie NF- κ B, comme les JNKK1 et JNKK2
- la métallo-protéase MMP9, ainsi qu'un inhibiteur de MMP, le TIMP-1
- des marqueurs d'inflammation : CRP, IL-1, IL-18, SAA1.
- des facteurs de croissance : GM-CSF (CSF2) et le G-CSF (CSF3)
- ...

De plus, nous avons montré que le LPS pouvait induire l'expression du gène codant pour l'endogline, protéine que l'on retrouve surexprimée dans des lésions d'athérosclérose (Ma et al. 2000).

Afin de confirmer un rôle central du facteur de transcription NF- κ B, nous avons utilisé un inhibiteur spécifique de ce facteur de transcription, le BAY 11-7082, sur les profils d'expression génique de macrophages murins RAW264.7 stimulés au LPS. Certains gènes surexprimés avec le LPS ont donc vu leur expression au niveau ARN revenir à un niveau d'activation plus faible. C'est le cas par exemple des gènes codant pour des cytokines (l'IL-1 β et l'IL-10), des chémokines (MCP-1, MCP-3 et RANTES), des marqueurs d'inflammation (TIMP-1, le CSF2, iNOS, la serpine-1), des acteurs intervenant dans d'autres voies de transduction du signal (JNKK2 et JAK2), ainsi que des gènes dont on a décrit récemment un rôle possible dans des processus inflammatoires, tels que BCL-3, intervenant dans la régulation négative des processus anti-inflammatoire déclenchés par certains signaux, dont le LPS. (Kuwata et al. 2003; Wessells et al. 2004).

Cependant, certains résultats sont discordants avec ce qui est typiquement reconnu dans la littérature. En effet, les gènes encodant les protéines TNF α , IL6, ou encore MMP9, ont vu leur expression augmentée en présence du BAY 11-7082, ce qui est en totale contradiction avec des résultats obtenus précédemment au laboratoire.

Nous n'avons pas d'explications à ces résultats discordants. Il est clair que les expériences réalisées dans ce travail sont préliminaires et basées sur deux hybridations seulement. De nouvelles hybridations, ainsi que des confirmations par RT-PCR en temps réel seront donc nécessaires. Il faut aussi souligner que nous avons rencontré des problèmes avec le BAY 11-7082, tant au niveau des expériences portant sur l'activation du facteur NF- κ B, que dans les expériences d'hybridation, avec des inhibitions parfois très faibles. Il faudra certainement envisager d'autres inhibiteurs plus fiables dans les expériences futures.

Nous confirmons que NF- κ B n'est pas responsable à lui seul des profils d'expression génique de macrophages murins en réponse au LPS, ce qui suggère que d'autres voies de transduction du signal interviendraient dans la régulation de cette réponse. De plus, nous savons que la voie des PI3K/Akt intervient également en partie dans la réponse au LPS. C'est pourquoi nous avons étudié les effets de deux inhibiteurs chimiques de la voie PI3K/Akt, et la rapamycine qui inhibe mTOR, sur les profils d'expression génique de macrophages murins stimulés au LPS.

Le LY294002 contrecarre la surexpression de la plupart des gènes induits par le LPS (15 sur les 23 repris dans le tableau III.3). Ces données suggèrent que la voie PI3K/Akt est donc bien nécessaire pour induire l'expression d'une majorité de gènes LPS-dépendants. Il faudrait donc aussi évaluer l'effet combiné d'un inhibiteur de la voie NF- κ B et du LY294002, pour voir si on peut encore renforcer l'effet inhibiteur observé. Bien que les effets du LY294002 soient en partie les mêmes que ceux observés avec le BAY 11-7082, on peut noter quelques effets propres au LY294002. C'est le cas par exemple pour la GCH, une enzyme impliquée dans la biosynthèse du BH4, un cofacteur essentiel de l'iNOS, une enzyme dont l'expression génique est également régulée par le LY294002 (Hattori et al. 1995).

La wortmannine, un autre inhibiteur de la PI3K, montre des effets similaires à ceux du LY294002, notamment dans l'expression des gènes encodant le MCP-1, le MCP-3, le CSF-3, la JNKK2. Cependant, nous avons pu souligner de nombreuses discordances entre ces deux inhibiteurs, comme déjà décrit dans la littérature. C'est par exemple le cas pour l'iNOS comme l'ont montré Hazeki et son équipe (2006), mais aussi pour les gènes encodant la MMP9 et l'IL10 par exemple.

Le troisième inhibiteur que nous avons utilisé, la rapamycine, cible la protéine mTOR, impliquée dans la voie PI3K, en aval de la kinase Akt. Les résultats obtenus sont très similaires à ce qui a pu être observé pour la wortmannine, comme illustré dans le tableau III.3. Nous observons en effet que l'expression des gènes encodant le MCP-3, le CSF-3, la JNKK2, est diminuée en présence des deux inhibiteurs. Parallèlement, nous observons des gènes dont la surexpression due au LPS est encore augmentée en présence de rapamycine, ce qui correspond à la suractivation de NF- κ B (et dans les tests de liaison à l'ADN, et pour l'activité transactivatrice – voir figures III. 13 et 20). C'est le cas par exemple pour les gènes encodant l'IL1 β , la MMP9, la iNOS, et les kinases JNKK1 et JAK2.

On constate donc que l'interprétation des résultats est difficile, étant donné d'une part la complexité de la signalisation induite par le LPS, le caractère préliminaire de nos données, et aussi la spécificité relative des inhibiteurs utilisés.

Pour avoir un meilleur contrôle de l'action des inhibiteurs, il faudrait certainement évaluer leurs effets en testant l'état de phosphorylation d'une des cibles de la kinase inhibée. Par exemple, il est possible de suivre pour mTOR, l'état de phosphorylation de 4E-BP1, ou l'activité de la p70/S6K lors de l'administration de rapamycine (Salh et al. 1998). Nous pourrions aussi comparer les effets du LY294002 et de la wortmannine sur l'état de phosphorylation de Akt, ou encore la dégradation d'I κ B comme l'ont fait Hazeki et son équipe (2006).

En parallèle à cette étude utilisant des inhibiteurs chimiques, l'utilisation de siRNA (small interfering RNA) dirigés contre les protéines clés des voies d'activation de NF- κ B, PI3Ks et mTOR pourrait être une alternative à l'utilisation d'inhibiteurs chimiques. Dans notre étude, nous avons déjà effectué le travail de mise au point d'un système de transfection d'ADN plasmidique dans les macrophages murins RAW264.7, ce qui pourra certainement servir de base pour la transfection de ces cellules avec des siRNA.

L'étude des voies de signalisation par analyse de profils d'expression génique, restent cependant une approche puissante qui permet d'avoir une vue d'ensemble sur les régulations fines et complexes dans un modèle cellulaire. Nous voyons effectivement qu'une voie de transduction du signal, par exemple la PI3K, ne régule pas de manière isolée l'expression d'un gène particulier, mais plutôt influence l'expression d'un "cluster" de gènes. A cet égard, nous avons pu montrer qu'un même inhibiteur pouvait exercer des effets opposés, avec un "cluster" de gènes régulés négativement, et un autre "cluster" de gènes régulés positivement. C'est particulièrement évident pour la rapamycine et la wortmannine, où les deux "clusters" se superposent en grande partie. Une analyse bioinformatique des promoteurs correspondant à ces gènes, compléterait également ce travail.

Les analyses de damiers à ADN peuvent cependant générer des faux positifs, et ce d'autant plus que le nombre de sondes de capture sur le damier est élevé. C'est pourquoi il est indispensable de valider les profils d'expression des gènes intéressants dans le contexte

d'étude actuel par RT-PCR quantitatives en temps réel. Dans un deuxième temps, il sera certainement indispensable de vérifier aussi certaines surexpressions au niveau protéinique.

Nous avons en outre observé que les voies des PI3K et de NF- κ B sont bien toutes deux impliquées dans la réponse des macrophages murins RAW264.7 au LPS. Les différents inhibiteurs utilisés au cours de ce mémoire ont montré des effets redondants entre eux, mais aussi des effets propres. Il serait dès lors intéressant d'étudier les effets combinés de ces inhibiteurs deux par deux afin d'évaluer leur complémentarité dans les réponses observées. Pour certains gènes d'intérêt, en particulier dans le contexte de l'athérosclérose tel le gène encodant l'endogline, il serait donc intéressant d'étudier au niveau de leur promoteur, les sites putatifs de liaison aux facteurs de transcription, et de tenter de décrire en détail les mécanismes moléculaires d'activation de la transcription de ces cibles en réponse au LPS.

Bien que les données de ce travail restent préliminaires, nous avons pu apporter des informations complémentaires sur les mécanismes moléculaires impliqués dans la réponse de monocytes macrophages au LPS, un agent bactérien induisant une réponse inflammatoire typique. Comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents à l'initiation et au développement de l'inflammation, aidera à mieux cibler les éventuelles cibles thérapeutiques dans le contexte de maladies inflammatoires chroniques, telle que l'athérosclérose, pour laquelle les monocytes/macrophages jouent un rôle central dans la réponse à l'inflammation

5. Bibliographie

Bibliographie.

- Adi, S., N. Y. Wu and S. M. Rosenthal (2001). "Growth factor-stimulated phosphorylation of Akt and p70(S6K) is differentially inhibited by LY294002 and Wortmannin." Endocrinology **142**(1): 498-501.
- Amura, C. R., T. Kamei, N. Ito, M. J. Soares and D. C. Morrison (1998). "Differential regulation of lipopolysaccharide (LPS) activation pathways in mouse macrophages by LPS-binding proteins." J Immunol **161**(5): 2552-60.
- Anderson, J. L. and J. B. Muhlestein (2004). "Antibiotic trials for coronary heart disease." Tex Heart Inst J **31**(1): 33-8.
- Arcaro, A. and M. P. Wymann (1993). "Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in neutrophil responses." Biochem J **296** (Pt 2): 297-301.
- Berliner, J. A., M. Navab, A. M. Fogelman, J. S. Frank, L. L. Demer, P. A. Edwards, A. D. Watson and A. J. Lusis (1995). "Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics." Circulation **91**(9): 2488-96.
- Bjorkbacka, H., K. A. Fitzgerald, F. Huet, X. Li, J. A. Gregory, M. A. Lee, C. M. Ordija, N. E. Dowley, D. T. Golenbock and M. W. Freeman (2004). "The induction of macrophage gene expression by LPS predominantly utilizes Myd88-independent signaling cascades." Physiol Genomics **19**(3): 319-30.
- Brand, K., S. Page, A. K. Walli, D. Neumeier and P. A. Baeuerle (1997). "Role of nuclear factor-kappa B in atherogenesis." Exp Physiol **82**(2): 297-304.
- Brunn, G. J., J. Williams, C. Sabers, G. Wiederrecht, J. C. Lawrence, Jr. and R. T. Abraham (1996). "Direct inhibition of the signaling functions of the mammalian target of rapamycin by the phosphoinositide 3-kinase inhibitors, wortmannin and LY294002." Embo J **15**(19): 5256-67.
- Cohen, H. J., T. Harris and C. F. Pieper (2003). "Coagulation and activation of inflammatory pathways in the development of functional decline and mortality in the elderly." Am J Med **114**(3): 180-7.
- Coleman, D. L., A. H. Bartiss, V. P. Sukhatme, J. Liu and H. D. Rupperecht (1992). "Lipopolysaccharide induces Egr-1 mRNA and protein in murine peritoneal macrophages." J Immunol **149**(9): 3045-51.
- Cortot, A., J. P. Armand and J. C. Soria (2006). "[PI3K-AKT-mTOR pathway inhibitors]." Bull Cancer **93**(1): 19-26.
- Costerton, J. W., J. M. Ingram and K. J. Cheng (1974). "Structure and function of the cell envelope of gram-negative bacteria." Bacteriol Rev **38**(1): 87-110.
- Denholm, E. M. and G. P. Stankus (1995). "Changes in the expression of MCP-1 receptors on monocytic THP-1 cells following differentiation to macrophages with phorbol myristate acetate." Cytokine **7**(5): 436-40.
- Dinarello, C. A. (1999). "Interleukin-18." Methods **19**(1): 121-32.
- Fresno Vara, J. A., E. Casado, J. de Castro, P. Cejas, C. Belda-Iniesta and M. Gonzalez-Baron (2004). "PI3K/Akt signalling pathway and cancer." Cancer Treat Rev **30**(2): 193-204.
- Frodin, M. and S. Gammeltoft (1999). "Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction." Mol Cell Endocrinol **151**(1-2): 65-77.
- Fukao, T. and S. Koyasu (2003). "PI3K and negative regulation of TLR signaling." Trends Immunol **24**(7): 358-63.
- Gadjeva, M., M. F. Tomczak, M. Zhang, Y. Y. Wang, K. Dull, A. B. Rogers, S. E. Erdman, J. G. Fox, M. Carroll and B. H. Horwitz (2004). "A role for NF-kappa B subunits p50

- and p65 in the inhibition of lipopolysaccharide-induced shock." *J Immunol* **173**(9): 5786-93.
- Gerdes, N., G. K. Sukhova, P. Libby, R. S. Reynolds, J. L. Young and U. Schonbeck (2002). "Expression of interleukin (IL)-18 and functional IL-18 receptor on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for atherogenesis." *J Exp Med* **195**(2): 245-57.
- Gomez-Hernandez, A., J. L. Martin-Ventura, E. Sanchez-Galan, C. Vidal, M. Ortego, L. M. Blanco-Colio, L. Ortega, J. Tunon and J. Egido (2005). "Overexpression of COX-2, Prostaglandin E Synthase-1 and Prostaglandin E Receptors in blood mononuclear cells and plaque of patients with carotid atherosclerosis: Regulation by nuclear factor-kappaB." *Atherosclerosis*.
- Guha, M. and N. Mackman (2001). "LPS induction of gene expression in human monocytes." *Cell Signal* **13**(2): 85-94.
- Gurfinkel, E. and V. Lerneud (2006). "The role of infection and immunity in atherosclerosis." *Expert Rev Cardiovasc Ther* **4**(1): 131-7.
- Hall, G., I. S. Singh, L. Hester, J. D. Hasday and T. B. Rogers (2005). "Inhibitor-kappaB kinase-beta regulates LPS-induced TNF-alpha production in cardiac myocytes through modulation of NF-kappaB p65 subunit phosphorylation." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **289**(5): H2103-11.
- Hamilton, J. A. and G. P. Anderson (2004). "GM-CSF Biology." *Growth Factors* **22**(4): 225-31.
- Hamilton, T. A., Y. Ohmori, J. M. Tebo and R. Kishore (1999). "Regulation of macrophage gene expression by pro- and anti-inflammatory cytokines." *Pathobiology* **67**(5-6): 241-4.
- Hansson, G. K. (2005). "Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease." *N Engl J Med* **352**(16): 1685-95.
- Hashimoto, S., K. Morohoshi, T. Suzuki and K. Matsushima (2003). "Lipopolysaccharide-inducible gene expression profile in human monocytes." *Scand J Infect Dis* **35**(9): 619-27.
- Hattori, Y., M. Oka, K. Kasai, N. Nakanishi and S. I. Shimoda (1995). "Lipopolysaccharide treatment in vivo induces tissue expression of GTP cyclohydrolase I mRNA." *FEBS Lett* **368**(2): 336-8.
- Hay, N. and N. Sonenberg (2004). "Upstream and downstream of mTOR." *Genes Dev* **18**(16): 1926-45.
- Hazeki, K., S. Kinoshita, T. Matsumura, K. Nigorikawa, H. Kubo and O. Hazeki (2006). "Opposite effects of wortmannin and LY294002 on TLR-mediated nitric oxide production: negative regulation of NF-kappaB by phosphoinositide 3-kinase." *Mol Pharmacol*.
- Kaklikkaya, I., N. Kaklikkaya, K. Buruk, Z. Pulathan, I. Koramaz, F. Aydin, I. Tosun, A. Osman Kilic and F. Ozcan (2006). "Investigation of Chlamydia pneumoniae DNA, chlamydial lipopolisaccharide antigens, and Helicobacter pylori DNA in atherosclerotic plaques of patients with aortoiliac occlusive disease." *Cardiovasc Pathol* **15**(2): 105-9.
- Kaneko, Y. S., K. Ikemoto, K. Mori, A. Nakashima, I. Nagatsu and A. Ota (2001). "Expression of GTP cyclohydrolase I in murine locus ceruleus is enhanced by peripheral administration of lipopolysaccharide." *Brain Res* **890**(2): 203-10.
- Kaperonis, E. A., C. D. Liapis, J. D. Kakisis, D. Dimitroulis and V. G. Papavassiliou (2006). "Inflammation and atherosclerosis." *Eur J Vasc Endovasc Surg* **31**(4): 386-93.
- Karin, M. and Y. Ben-Neriah (2000). "Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-kappaB activity." *Annu Rev Immunol* **18**: 621-63.

- Kim, W. K., S. Y. Hwang, E. S. Oh, H. Z. Piao, K. W. Kim and I. O. Han (2004). "TGF-beta1 represses activation and resultant death of microglia via inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity." *J Immunol* **172**(11): 7015-23.
- Kim, Y. H., K. H. Choi, J. W. Park and T. K. Kwon (2005). "LY294002 inhibits LPS-induced NO production through a inhibition of NF-kappaB activation: independent mechanism of phosphatidylinositol 3-kinase." *Immunol Lett* **99**(1): 45-50.
- Kopydlowski, K. M., C. A. Salkowski, M. J. Cody, N. van Rooijen, J. Major, T. A. Hamilton and S. N. Vogel (1999). "Regulation of macrophage chemokine expression by lipopolysaccharide in vitro and in vivo." *J Immunol* **163**(3): 1537-44.
- Kutuk, O. and H. Basaga (2003). "Inflammation meets oxidation: NF-kappaB as a mediator of initial lesion development in atherosclerosis." *Trends Mol Med* **9**(12): 549-57.
- Kuwata, H., Y. Watanabe, H. Miyoshi, M. Yamamoto, T. Kaisho, K. Takeda and S. Akira (2003). "IL-10-inducible Bcl-3 negatively regulates LPS-induced TNF-alpha production in macrophages." *Blood* **102**(12): 4123-9.
- Li, J. J. and J. L. Chen (2005). "Inflammation may be a bridge connecting hypertension and atherosclerosis." *Med Hypotheses* **64**(5): 925-9.
- Libby, P. (2002). "Inflammation in atherosclerosis." *Nature* **420**(6917): 868-74.
- Lind, L. (2003). "Circulating markers of inflammation and atherosclerosis." *Atherosclerosis* **169**(2): 203-14.
- Linton, M. F. and S. Fazio (2003). "Macrophages, inflammation, and atherosclerosis." *Int J Obes Relat Metab Disord* **27 Suppl 3**: S35-40.
- Lusis, A. J. (2000). "Atherosclerosis." *Nature* **407**(6801): 233-41.
- Ma, X., M. Labinaz, J. Goldstein, H. Miller, W. J. Keon, M. Letarte and E. O'Brien (2000). "Endoglin is overexpressed after arterial injury and is required for transforming growth factor-beta-induced inhibition of smooth muscle cell migration." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**(12): 2546-52.
- Magnani, M., R. Crinelli, M. Bianchi and A. Antonelli (2000). "The ubiquitin-dependent proteolytic system and other potential targets for the modulation of nuclear factor-kB (NF-kB)." *Curr Drug Targets* **1**(4): 387-99.
- Manna, S. K. and B. B. Aggarwal (2000). "Wortmannin inhibits activation of nuclear transcription factors NF-kappaB and activated protein-1 induced by lipopolysaccharide and phorbol ester." *FEBS Lett* **473**(1): 113-8.
- Melero, C. P. M., M; San Feleciario, A (2000). "A Short review on cardiotoxic steroids and their aminoguanidines analogues." *Molecules* **5**: 51-81.
- Mijatovic, T., A. Op De Beeck, E. Van Quaquebeke, J. Dewelle, F. Darro, Y. de Launoit and R. Kiss (2006). "The cardenolide UNBS1450 is able to deactivate nuclear factor kappaB-mediated cytoprotective effects in human non-small cell lung cancer cells." *Mol Cancer Ther* **5**(2): 391-9.
- Minhajuddin, M., F. Fazal, K. M. Bijli, M. R. Amin and A. Rahman (2005). "Inhibition of mammalian target of rapamycin potentiates thrombin-induced intercellular adhesion molecule-1 expression by accelerating and stabilizing NF-kappa B activation in endothelial cells." *J Immunol* **174**(9): 5823-9.
- Monick, M. M., A. B. Carter, D. M. Flaherty, M. W. Peterson and G. W. Hunninghake (2000). "Protein kinase C zeta plays a central role in activation of the p42/44 mitogen-activated protein kinase by endotoxin in alveolar macrophages." *J Immunol* **165**(8): 4632-9.
- Monick, M. M., A. B. Carter, P. K. Robeff, D. M. Flaherty, M. W. Peterson and G. W. Hunninghake (2001). "Lipopolysaccharide activates Akt in human alveolar macrophages resulting in nuclear accumulation and transcriptional activity of beta-catenin." *J Immunol* **166**(7): 4713-20.

- Nelson, F. C., S. J. Stachel, C. P. Eng and S. N. Sehgal (1999). "Manipulation of the C(22)-C(27) region of rapamycin: stability issues and biological implications." Bioorg Med Chem Lett **9**(2): 295-300.
- Oren, H., N. Duman, H. Abacioglu, H. Ozkan and G. Irken (2001). "Association between serum macrophage colony-stimulating factor levels and monocyte and thrombocyte counts in healthy, hypoxic, and septic term neonates." Pediatrics **108**(2): 329-32.
- Osterud, B. and E. Bjorklid (2003). "Role of monocytes in atherogenesis." Physiol Rev **83**(4): 1069-112.
- Ougolkov, A. V., M. E. Fernandez-Zapico, D. N. Savoy, R. A. Urrutia and D. D. Billadeau (2005). "Glycogen synthase kinase-3beta participates in nuclear factor kappaB-mediated gene transcription and cell survival in pancreatic cancer cells." Cancer Res **65**(6): 2076-81.
- Palsson-McDermott, E. M. and L. A. O'Neill (2004). "Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4." Immunology **113**(2): 153-62.
- Park, Y. C., C. H. Lee, H. S. Kang, H. T. Chung and H. D. Kim (1997). "Wortmannin, a specific inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase, enhances LPS-induced NO production from murine peritoneal macrophages." Biochem Biophys Res Commun **240**(3): 692-6.
- Pengal, R. A., L. P. Ganesan, G. Wei, H. Fang, M. C. Ostrowski and S. Tridandapani (2006). "Lipopolysaccharide-induced production of interleukin-10 is promoted by the serine/threonine kinase Akt." Mol Immunol **43**(10): 1557-64.
- Pepine, C. J. (2001). "Why vascular biology matters." Am J Cardiol **88**(8A): 5K-9K.
- Piao, M. and O. Tokunaga (2006). "Significant Expression of Endoglin (CD105), TGFbeta-1 and TGFbeta R-2 in the Atherosclerotic Aorta: An Immunohistological Study." J Atheroscler Thromb **13**(2): 82-9.
- Pierce, J. W., R. Schoenleber, G. Jesmok, J. Best, S. A. Moore, T. Collins and M. E. Gerritsen (1997). "Novel inhibitors of cytokine-induced IkappaBalpha phosphorylation and endothelial cell adhesion molecule expression show anti-inflammatory effects in vivo." J Biol Chem **272**(34): 21096-103.
- Potter, M. W., S. A. Shah, K. K. Elbirt and M. P. Callery (2001). "Endotoxin (LPS) stimulates 4E-BP1/PHAS-I phosphorylation in macrophages." J Surg Res **97**(1): 54-9.
- Powis, G., R. Bonjouklian, M. M. Berggren, A. Gallegos, R. Abraham, C. Ashendel, L. Zalkow, W. F. Matter, J. Dodge, G. Grindey and et al. (1994). "Wortmannin, a potent and selective inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase." Cancer Res **54**(9): 2419-23.
- Proud, C. G. (2004). "The multifaceted role of mTOR in cellular stress responses." DNA Repair (Amst) **3**(8-9): 927-34.
- Raschke W.C., B. S. e. a. (1978). "Functional macrophage cell lines transformed by abelson leukemia virus." Cell **15**(1): 261-267.
- Renard, P., I. Ernest, A. Houbion, M. Art, H. Le Calvez, M. Raes and J. Remacle (2001). "Development of a sensitive multi-well colorimetric assay for active NFkappaB." Nucleic Acids Res **29**(4): E21.
- Renard, P. and M. Raes (1999). "The proinflammatory transcription factor NFkappaB: a potential target for novel therapeutical strategies." Cell Biol Toxicol **15**(6): 341-4.
- Riches, D. W., E. D. Chan and B. W. Winston (1996). "TNF-alpha-induced regulation and signalling in macrophages." Immunobiology **195**(4-5): 477-90.
- Robbesyn, F., R. Salvayre and A. Negre-Salvayre (2004). "Dual role of oxidized LDL on the NF-kappaB signaling pathway." Free Radic Res **38**(6): 541-51.
- Romano Carratelli, C., I. Nuzzo, D. Cozzolino, C. Bentivoglio, R. Paolillo and A. Rizzo (2006). "Relationship between Chlamydia pneumoniae infection, inflammatory markers, and coronary heart diseases." Int Immunopharmacol **6**(5): 848-53.

- Ross, R. (1999). "Atherosclerosis--an inflammatory disease." *N Engl J Med* **340**(2): 115-26.
- Rowinsky, E. K. (2004). "Targeting the molecular target of rapamycin (mTOR)." *Curr Opin Oncol* **16**(6): 564-75.
- Salh, B., R. Wagey, A. Marotta, J. S. Tao and S. Pelech (1998). "Activation of phosphatidylinositol 3-kinase, protein kinase B, and p70 S6 kinases in lipopolysaccharide-stimulated Raw 264.7 cells: differential effects of rapamycin, Ly294002, and wortmannin on nitric oxide production." *J Immunol* **161**(12): 6947-54.
- Sarbassov dos, D., S. M. Ali and D. M. Sabatini (2005). "Growing roles for the mTOR pathway." *Curr Opin Cell Biol* **17**(6): 596-603.
- Shor, A. and J. I. Phillips (1999). "Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis." *Jama* **282**(21): 2071-3.
- Sizemore, N., S. Leung and G. R. Stark (1999). "Activation of phosphatidylinositol 3-kinase in response to interleukin-1 leads to phosphorylation and activation of the NF-kappaB p65/RelA subunit." *Mol Cell Biol* **19**(7): 4798-805.
- Stocker, R. and J. F. Keaney, Jr. (2004). "Role of oxidative modifications in atherosclerosis." *Physiol Rev* **84**(4): 1381-478.
- Sweet, M. J. and D. A. Hume (1996). "Endotoxin signal transduction in macrophages." *J Leukoc Biol* **60**(1): 8-26.
- Tedgui, A., Mallat, Z. (2001). "Athérosclérose et inflammation." *Médecine/sciences* **17**: 162-169.
- Tian, B. and A. R. Brasier (2003). "Identification of a nuclear factor kappa B-dependent gene network." *Recent Prog Horm Res* **58**: 95-130.
- Tsirpanlis, G., S. Chatzipanagiotou, A. Ioannidis, F. Boufidou, S. Moutafis and C. Nicolaou (2005). "Serum and peripheral blood mononuclear cells infectious burden: correlation to inflammation and atherosclerosis in haemodialysis patients." *Nephrology (Carlton)* **10**(3): 256-63.
- Tsuchiya, S., M. Yamabe, Y. Yamaguchi, Y. Kobayashi, T. Konno and K. Tada (1980). "Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1)." *Int J Cancer* **26**(2): 171-6.
- Ulmer, A. J., Rietschel, E.Th., Zähringer, U., Heine, H. (2002). "Lipopolysaccharide: Structure, Bioactivity, Receptors, and signal transduction." *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* **14**: 53-68.
- Van Quaquebeke, E., G. Simon, A. Andre, J. Dewelle, M. E. Yazidi, F. Bruyneel, J. Tuti, O. Nacoulma, P. Guissou, C. Decaestecker, J. C. Braekman, R. Kiss and F. Darro (2005). "Identification of a novel cardenolide (2"-oxovoruscharin) from *Calotropis procera* and the hemisynthesis of novel derivatives displaying potent in vitro antitumor activities and high in vivo tolerance: structure-activity relationship analyses." *J Med Chem* **48**(3): 849-56.
- Vanden Berghe, W., N. Dijsselbloem, L. Vermeulen, N. Ndlovu, E. Boone and G. Haegeman (2006). "Attenuation of mitogen- and stress-activated protein kinase-1-driven nuclear factor-kappaB gene expression by soy isoflavones does not require estrogenic activity." *Cancer Res* **66**(9): 4852-62.
- Vanhaesebroeck, B. and D. R. Alessi (2000). "The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB." *Biochem J* **346 Pt 3**: 561-76.
- Vanhaesebroeck, B., K. Ali, A. Bilancio, B. Geering and L. C. Foukas (2005). "Signalling by PI3K isoforms: insights from gene-targeted mice." *Trends Biochem Sci* **30**(4): 194-204.
- Vanhaesebroeck, B. and M. D. Waterfield (1999). "Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases." *Exp Cell Res* **253**(1): 239-54.

- Vertegaal, A. C., H. B. Kuiperij, S. Yamaoka, G. Courtois, A. J. van der Eb and A. Zantema (2000). "Protein kinase C- α is an upstream activator of the I κ B kinase complex in the TPA signal transduction pathway to NF- κ B in U2OS cells." Cell Signal **12**(11-12): 759-68.
- Vignot, S., S. Faivre, D. Aguirre and E. Raymond (2005). "mTOR-targeted therapy of cancer with rapamycin derivatives." Ann Oncol **16**(4): 525-37.
- Vines, A., S. Cahoon, I. Goldberg, U. Saxena and S. Pillarisetti (2006). "Novel inflammatory role for glycogen synthase-3 β in the inhibition of TNF- α and IL-1 β induced inflammatory gene expression." J Biol Chem.
- Vlahos, C. J., W. F. Matter, K. Y. Hui and R. F. Brown (1994). "A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002)." J Biol Chem **269**(7): 5241-8.
- Walston, J., M. A. McBurnie, A. Newman, R. P. Tracy, W. J. Kop, C. H. Hirsch, J. Gottdiener and L. P. Fried (2002). "Frailty and activation of the inflammation and coagulation systems with and without clinical comorbidities: results from the Cardiovascular Health Study." Arch Intern Med **162**(20): 2333-41.
- Weinstein, S. L., A. J. Finn, S. H. Dave, F. Meng, C. A. Lowell, J. S. Sanghera and A. L. DeFranco (2000). "Phosphatidylinositol 3-kinase and mTOR mediate lipopolysaccharide-stimulated nitric oxide production in macrophages via interferon- β ." J Leukoc Biol **67**(3): 405-14.
- Wessells, J., M. Baer, H. A. Young, E. Claudio, K. Brown, U. Siebenlist and P. F. Johnson (2004). "BCL-3 and NF- κ B p50 attenuate lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in macrophages." J Biol Chem **279**(48): 49995-50003.
- Wipf, P. and R. J. Halter (2005). "Chemistry and biology of wortmannin." Org Biomol Chem **3**(11): 2053-61.
- Woodgett, J. (2001). "Protein Kinases: Physiological Roles." Encyclopedia of Life Sciences: 1-9.
- Wu, D., M. Marko, K. Claycombe, K. E. Paulson and S. N. Meydani (2003). "Ceramide-induced and age-associated increase in macrophage COX-2 expression is mediated through up-regulation of NF- κ B activity." J Biol Chem **278**(13): 10983-92.
- Zhu, X. and C. M. Craft (2000). "Modulation of CRX transactivation activity by phosducin isoforms." Mol Cell Biol **20**(14): 5216-26.